



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos



**“Cambios en el tiempo de floración mediados por
microARNs en plantas de *Arabidopsis thaliana*
expuestas a radiación UV-B”**

María Soledad Soto

Tesis para optar al título de Licenciada en Biotecnología

Directora

Dra. Marcela Dotto

Rosario, Marzo 2018, Argentina

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar pidiendo disculpas a aquellas personas que pudiera haber olvidado en estos agradecimientos.

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de tesina Marcela por la oportunidad de realizar esta tesina, por sus enseñanzas, su predisposición y paciencia en todo momento.

A todos los que integran y trabajan en el CEFOTI, por su colaboración y su excelente predisposición en todo momento. Aquí quiero mencionar especialmente a Mauro y a Juan por los fines de semana que me bancaron. Mil e infinitas gracias a los integrantes y teginistas del Lab1: Evi, Sol, Sil, Colo, Juli E, Juli F, Fiore, y Ro que me recibieron sin reservas, me ayudaron en todo momento, aun interrumpiendo su propio trabajo y además fueron una hermosa compañía. A Lore, gracias por tu energía, por tu apoyo, por los fines de semana y por la ayuda desinteresada, una genia; no me olvido de la Dra. Paula Casati que generosamente me recibió en su laboratorio. Muy agradecida también con todas las integrantes del Lab6: Claudia, Lu, Valen, Romi y Michelle siempre prestas a darme una mano.

Por último a mis afectos, a Sole, por darme ánimos, por ser la mejor amiga que se puede tener; a mi familia, por su apoyo incondicional y acompañarme siempre, a Wilma sin cuya ayuda no habría podido lograrlo. A mi papá por su apoyo incondicional, a mi mamá por ser mi motor aún hoy, a ambos por todo, por todo lo que significa ser padres. A Walter por compartir la vida conmigo, por ser mi apoyo, mi contención y mi cable a tierra; y a la persona más importante de mi vida, Lucas, al que le debo muchas horas de juegos, de paseos, de tareas y de invitaciones a jugar.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

Publicaciones

- Marcela Dotto, María Sol Gómez, María Soledad Soto, Paula Casati. (2018) "UV-B radiation delays flowering time through changes in the PRC2 complex activity and miR156 levels in *Arabidopsis thaliana*". *Plant, Cell & Environment*, doi: 10.1111/pce.13166

Presentaciones a congresos

- III Reunión de Fotobiólogos Moleculares Argentinos. San Miguel de Tucumán, Argentina. Agosto de 2016. "Efectos de la radiación UV-B sobre el tiempo de floración en *Arabidopsis thaliana*". Marcela Dotto, María Soledad Soto, Paula Casati.
- Simposio de Genómica Funcional de Plantas. Rosario, Argentina. Mayo 2017. "Efectos de la radiación UV-B sobre el tiempo de floración en *Arabidopsis thaliana*". Marcela Dotto, María Soledad Soto, Paula Casati

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS.....	3
Publicaciones	3
Presentaciones a congresos	3
ÍNDICE	i
ABREVIATURAS.....	iv
ANGLICISMOS.....	v
RESUMEN.....	vi
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Efectos de la radiación UV-B	1
1.1.1 La luz UV-B y sus efectos sobre las plantas	1
1.1.2 Mecanismos de respuesta de las plantas a la radiación UV-B	2
1.2 Rutas genéticas de regulación de la floración.....	3
1.3 Los microARNs y sus funciones regulatorias en plantas.....	5
1.3.1 El rol de los microARNs en la regulación de la expresión génica.	6
1.3.2 El rol de los microARNs en el desarrollo.....	6
1.3.3 La familia de miR156 y sus genes blanco.....	7
1.3.4 La familia de miR172 y sus genes blanco.....	8
1.3.5 El rol de miR156 y miR172 en las transiciones de fase del desarrollo.....	9
1.3.6 El rol de la ruta de la edad en la respuesta a UV-B	10
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo General	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1 Material vegetal.....	12
3.2 Condiciones de crecimiento	12

3.3	Tratamiento con luz UV-B	13
3.4	Determinación del tiempo de floración	13
3.5	Determinación de la aparición de tricomas abaxiales	13
3.6	Extracción de ADN genómico	13
3.7	Extracción de ARN total	14
3.8	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	14
3.9	Electroforesis de ácidos nucleicos	15
3.10	Cuantificación de ARN	16
3.11	Tratamiento con ADNasa	16
3.12	Reacción de retrotranscripción.....	16
3.13	PCR en tiempo real (qRT-PCR).....	17
3.14	Análisis estadístico.....	19
4	RESULTADOS	20
4.1	Efectos de la luz UV-B en Arabidopsis.....	20
4.2	Papel de la ruta de la edad en el retraso de la floración causado por la radiación UV-B	20
4.2.1	Efecto de la radiación UV-B sobre la expresión de los componentes de la ruta de la edad.....	21
4.2.2	Efecto de la radiación UV-B sobre la aparición de tricomas abaxiales	22
4.3	Caracterización fenotípica de las líneas mutantes y transgénicas	23
4.3.1	Línea sobreexpresante <i>miR156ox</i>	23
4.3.2	Línea mutante <i>sp19-4</i>	24
4.3.3	Línea sobreexpresante <i>miR172ox</i>	25
4.3.4	Línea doble mutante <i>toe1-2/toe2-1</i>	25
4.4	Caracterización genotípica de las plantas mutantes.....	26
4.4.1	Genotipado de plantas de la línea <i>sp19-4</i>	27
4.4.2	Genotipado de plantas de la línea <i>toe1-2/toe2-1</i>	27

4.5	Efecto de la radiación UV-B sobre líneas modificadas en componentes de la ruta de la edad.....	29
4.5.1	miR156 y sus genes blanco.....	29
4.5.2	miR172 y sus genes blanco.....	31
5	DISCUSIÓN	32
5.1	La radiación UV-B retrasa el tiempo de floración de Arabidopsis	33
5.2	La expresión de genes pertenecientes a la ruta de la edad se modifica en plantas tratadas con UV-B	33
5.3	Influencia de la radiación UV-B sobre plantas transgénicas y mutantes en componentes de la ruta de la edad.	34
5.3.1	La exposición a UV-B modifica el tiempo de floración en plantas <i>sp/9-4</i> y <i>miR156ox</i>	34
5.3.2	La radiación UV-B retrasa la floración en plantas <i>toe1-2/toe2-1</i> pero no modifica la de plantas <i>miR172ox</i>	36
6	CONCLUSIONES.....	37
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

ABREVIATURAS

ADN-T	ADN de transferencia, proveniente del plásmido Ti de <i>Agrobacterium sp.</i>
CaMV35S	Promotor 35S del virus del mosaico del coliflor
DEPC	Dietilpirocarbonato
DTT	Ditiotreitol
EROs	Especies reactivas del oxígeno
LB-SAIL/SALK	Borde izquierdo del ADN-T en líneas SAIL o SALK
TBE	Tris Borato EDTA
ORF	Marco abierto de lectura, por sus siglas en inglés (Open Reading Frame)

ANGLICISMOS

Buffer: solución reguladora, amortiguadora o tampón, que permite controlar la concentración libre de un determinado componente a pesar de un cambio en su concentración total (por ejemplo pH).

Stem-loop: estructura en tallo-bucle

Stock: lote de algún producto que se mantiene de reserva, en el presente trabajo se refiere a semillas de un determinado genotipo

RESUMEN

Las plantas están inevitablemente expuestas a la radiación UV-B debido a que son organismos sésiles y además necesitan absorber fotones de la luz solar para realizar fotosíntesis. Si bien el porcentaje de incidencia de la radiación UV-B sobre la superficie terrestre es pequeño, es el componente de mayor energía de la luz solar no retenida en la atmósfera y con el potencial de causar severos daños en todos los seres vivos. Se ha demostrado además, que en las plantas también puede inducir numerosos cambios en el crecimiento y en el desarrollo, como por ejemplo en el tiempo de floración. El conocimiento actual de los mecanismos moleculares que subyacen a estos cambios es muy limitado.

El presente trabajo demuestra que en estas condiciones experimentales, la exposición diaria de plantas de *Arabidopsis thaliana* a la irradiación con luz UV-B retrasa el tiempo de floración. El análisis de estudios de expresión génica combinado con tratamientos con luz UV-B sobre plantas transgénicas y mutantes en componentes de la ruta de la edad, demostró que la irradiación con UV-B produce cambios que resultan en un retraso en la transición de fase juvenil a adulta y un retraso en la floración.

Introducción

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Efectos de la radiación UV-B

1.1.1 La luz UV-B y sus efectos sobre las plantas

La luz solar irradia energía en un amplio rango de longitudes de onda, entre las cuales se encuentra la radiación ultravioleta que es una de las partes no ionizantes del espectro electromagnético. La región ultravioleta (UV) comprende tres regiones espectrales: la región UV-A (320-400 nm), la región UV-B (280-320 nm) y la región UV-C (200-280 nm). La radiación UV-C es la más energética y letal, pero es completamente absorbida por los gases de oxígeno y ozono atmosféricos y por lo tanto no alcanza la superficie terrestre. La radiación UV-A que llega a la superficie terrestre es aproximadamente un 6% del total de la radiación solar, siendo la menos retenida por la capa de ozono. Sin embargo, UV-A es la menos perjudicial y además es una señal fotomorfogénica importante en el desarrollo de las plantas. Por su parte, la radiación UV-B es fuertemente retenida en la atmósfera y representa sólo el 0.5 % de la radiación solar total que llega a la superficie terrestre. A pesar del pequeño porcentaje, la alta energía de la radiación UV-B puede afectar biomoléculas importantes causando severos daños biológicos en todos los organismos vivos (Casati y Walbot, 2003; Frohnmeier y Staiger, 2003; Singh y col., 2017).

La evolución de la vida desde formas unicelulares subacuáticas a formas multicelulares terrestres fue posible dada la formación de la capa de ozono que redujo cerca de 10.000 veces la cantidad de UV-B que recibía la superficie de la Tierra. Sin embargo, en las últimas décadas la cantidad de UV-B en la biósfera ha aumentado significativamente como consecuencia de actividades humanas, amenazando la vida en la Tierra. El uso extensivo de clorofluorocarbonos (compuestos químicos halogenados con vida media de 50 a 150 años), la liberación de radicales libres como por ejemplo radicales hidroxilo (OH^{\bullet}), radicales óxido nítrico (NO^{\bullet}), y radicales Cloro y Bromo (Cl^{\bullet} y Br^{\bullet}) han reducido sustancialmente la capa de ozono estratosférico, con la consiguiente reducción en la absorción de UV-B (Frohnmeier y Staiger, 2003; Singh y col., 2017). El aumento de UV-B afecta significativamente la morfología, fisiología, y la producción de metabolitos secundarios en las plantas. Incluso un pequeño incremento en la radiación UV-B incidente puede tener efectos significativos ya que es biológicamente activa hacia

macromoléculas y componentes celulares como los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y quinonas que pueden absorber la radiación UV-B directamente. Dado su espectro de absorción, el ADN es particularmente sensible al daño por UV-B ya que se forman dímeros de pirimidinas y fotoproductos que pueden impedir la replicación y la transcripción (Casati y Walbot, 2003; Frohnmeyer y Staiger, 2003; Kataria y col., 2014). El ARN se une a proteínas ribosomales específicas y como consecuencia disminuye la traducción (Casati y col., 2005). La radiación UV-B inhibe la fotosíntesis afectando el aparato fotosintético, por pérdida de integridad de la membrana tilacoides, daño extensivo al fotosistema II, reducción de la actividad y degradación proteolítica de la Rubisco (Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa) lo que resulta en una disminución en la fijación de CO₂, y destrucción de clorofila y carotenoides (Frohnmeyer y Staiger, 2003; Kataria y col., 2014); también se ha documentado que se produce una reducción significativa en la expresión de genes asociados a la fotosíntesis en presencia de radiación UV-B (Casati y col., 2005). Además de los efectos directos de la exposición a UV-B, la formación de especies reactivas al oxígeno (EROs) da lugar al estrés oxidativo que resulta en un aumento de la oxidación de lípidos y proteínas (Parihar y col., 2015). Entre los daños morfológicos que produce la radiación UV-B están la decoloración de hojas, reducción de la biomasa y del rendimiento de granos (Singh y col., 2017).

1.1.2 Mecanismos de respuesta de las plantas a la radiación UV-B

Las plantas están inevitablemente expuestas a la radiación UV-B debido a su condición sésil y a su necesidad de absorber fotones de la luz solar para la fotosíntesis. En consecuencia, han desarrollado dos tipos de respuesta, en gran parte independientes una de la otra: respuesta al estrés producido por luz UV-B y respuesta fotomorfogénica. El tipo de respuesta depende del tiempo de exposición, la longitud de onda, el grado de exposición previa y de factores ambientales. La exposición a altos niveles de radiación UV-B induce procesos fisiológicos relacionados al estrés como por ejemplo el daño al ADN, la producción de EROs y desacoplamiento de procesos celulares. Este tipo de respuestas parecen estar mediadas por vías que no son específicas de UV-B, sino que estimulan las respuestas generales al estrés y por lo tanto son compartidas con otros estreses ambientales (Kataria y col., 2014). Por otro lado, la exposición a bajos niveles de UV-B promueve respuestas protectoras tanto a nivel celular como a nivel bioquímico.

Estas respuestas protectoras sólo son estimuladas por la exposición a UV-B y son fotomorfogénicas. En los últimos años se ha documentado que la radiación UV-B es percibida por las plantas como una señal para este tipo de respuestas (Parihar y col., 2015) y que están mediadas por un amplio número de genes cuya expresión se ve alterada por la exposición a la radiación UV-B. (Casati y Walbot, 2003; Casati y col., 2005; Morales y col., 2013). Una respuesta muy importante es la biosíntesis de compuestos secundarios, principalmente compuestos fenólicos y flavonoides, que se acumulan en las vacuolas de las células de la epidermis y atenúan la penetración del UV-B en las capas celulares más profundas (Frohnmeier y Staiger, 2003; Singh y col., 2017). Asimismo, las plantas responden a la exposición a radiación UV-B a través de la reprogramación de varios aspectos de su desarrollo, incluyendo la inhibición de la elongación del hipocótilo, la reducción del área de las hojas, el acortamiento de los internodos, la reducción de la biomasa, la **alteración de la floración** y de la fertilidad. Es importante destacar que en el caso particular de las alteraciones en el proceso de floración, el conocimiento a nivel molecular de las rutas afectadas por la radiación UV-B es muy limitado (Dotto y Casati, 2017).

1.2 Rutas genéticas de regulación de la floración

Las plantas perciben múltiples señales ambientales y endógenas que le permiten determinar cuándo florecer. Para ello han desarrollado una compleja red de rutas genéticas que integran esa información, de manera de asegurar su éxito reproductivo floreciendo sólo cuando las condiciones son las idóneas en tiempo y espacio. (Yamaguchi y Abe, 2012). En *Arabidopsis*, las rutas genéticas principales que regulan la transición de la fase vegetativa a la fase reproductiva son: la **ruta del fotoperiodo**, la **ruta de la vernalización**, la **ruta autónoma**, la **ruta de las giberelinas** y la **ruta de la edad**. La ruta del fotoperiodo reconoce la cantidad de horas de luz percibidas por la planta y la ruta de la vernalización media la respuesta a la exposición a un periodo prolongado de bajas temperaturas. De este modo, la planta percibe un aumento en la longitud del día y el paso por un prolongado periodo de bajas temperaturas, como el invierno, lo cual le permite reconocer el comienzo de la primavera. Paralelamente, la ruta autónoma recibe información acerca del momento de desarrollo en el que se encuentra la planta y de la temperatura ambiental; la ruta de las giberelinas integra distintas señales ambientales y endógenas, y es necesaria para la floración en condiciones de día corto. La última

ruta reguladora que se ha descrito es la ruta de la edad, que integra información de la edad de la planta e implica la acción de los microARNs miR156 y miR172. Si bien la floración se halla regulada por estas cinco rutas genéticas diferentes, se ha demostrado que existe un elevado nivel de comunicación entre las mismas (Srikanth y Schmid, 2011). Así, distintas rutas regulan la expresión de un número relativamente pequeño de **genes integradores**: *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) y *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1* (*SOC1*), aunque también se incluyen en este grupo a *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) y a *LEAFY* (*LFY*).

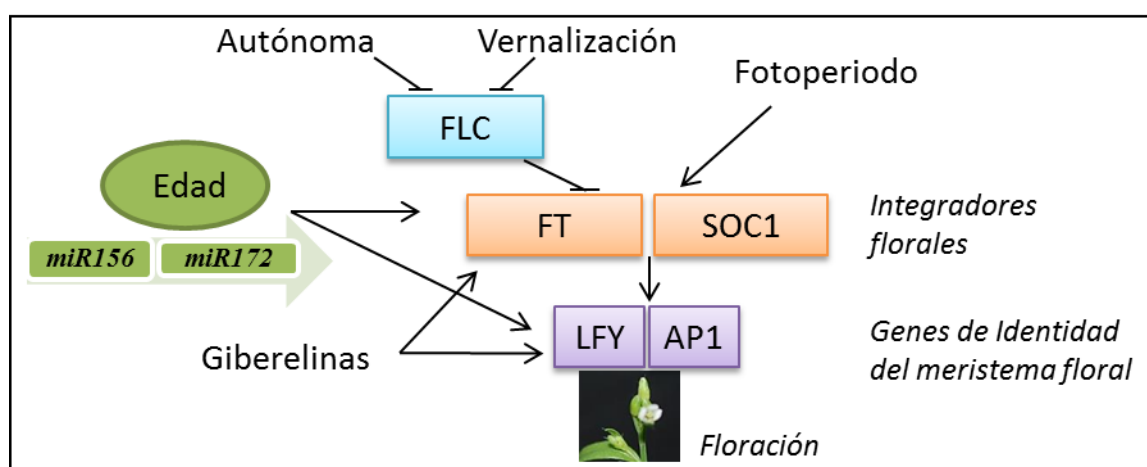


Figura 1: Rutas genéticas de control de la floración. Las rutas principales de regulación de la floración convergen en un número pequeño de genes integradores: *FLC*, *FT* y *SOC1*. Las flechas indican inducción y las flechas truncas indican inhibición. Adaptado de Yamaguchi y col, 2012

Las rutas de vernalización y autónoma reprimen la expresión de *FLC*, que codifica para un factor de transcripción que actúa como represor de la floración a través de *FT* y *SOC1*, (Figura 1); a su vez *FT* y *SOC1* están regulados positivamente por la ruta del fotoperiodo y la ruta de las giberelinas afecta la expresión de *FT*, *SOC1* y *LFY*. La activación de *FT* es crucial para el inicio de la floración: después de la transcripción de *FT* en las hojas en respuesta a estímulos ambientales y endógenos, *FT* circula a través del floema hasta el meristema apical donde inicia el desarrollo floral. Los integradores florales, a su vez, activan los llamados **genes de identidad del meristema floral**, entre los que se encuentran *LFY* y *AP1* (Figura 1). Los principales componentes de la ruta de la edad, miR156 y miR172, actúan secuencialmente para regular el inicio de la competencia reproductiva. La actividad de esta ruta resulta en la regulación de la expresión de los integradores florales *FT* y

SOC1 como así también en la activación directa de *LFY* (Yamaguchi y Abe, 2012; Spanudakis y Jackson, 2014). El tiempo de floración puede ser afectado además, por la calidad de la luz, la temperatura ambiente y estreses bióticos y abióticos a través de una o más de estas rutas (Cho y col., 2017).

1.3 Los microARNs y sus funciones regulatorias en plantas

Los microARNs (miARNs) son ARNs pequeños que tienen típicamente entre 20 y 22 nucleótidos de largo y actúan como reguladores maestros de la expresión génica, induciendo el silenciamiento de genes específicos, y en plantas, actúan generalmente a nivel post-transcripcional. Los miARNs maduros reconocen sitios de unión que son secuencias complementarias en los transcritos de sus genes blanco. En plantas, estos sitios de unión exhiben complementariedad de bases perfectas o casi perfectas y se encuentran en regiones codificantes o en las regiones 5' o 3' no traducidas (Aung y col, 2015). El mecanismo de biogénesis de los miARNs en plantas ha sido bien estudiado en *Arabidopsis* (Figura 2). Brevemente, el proceso comienza en el núcleo con la transcripción de un gen *MIR* por la ARN polimerasa II. El miARN primario (pri-miARN) corresponde al ARN mensajero (ARNm) con sus características: la caperuza 5', la cola poliadenilada 3' e intrones que se escinden. Sin embargo, la característica distintiva del pri-miARN es la estructura de tallo-burbuja que lo distingue de otros ARNs pequeños. El procesamiento del pri-miARN se produce en dos pasos: primero se produce la liberación de la estructura de tallo-burbuja para formar el pre-miARN, el cual es cortado en un segundo paso para formar el dúplex de miARN/miARN*, que consiste en la hebra guía (miARN) y la hebra pasajera (miARN*). La enzima DICER-LIKE 1 (DCL1), una ARNasa tipo III, cataliza ambos cortes para el procesamiento de pri-miARN y pre-miARN. El dúplex miARN/miARN*, es modificado antes de ser exportado al citoplasma, donde pasa a formar parte del Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés) que contiene la proteína ARGONAUTA (AGO). En el complejo RISC, el dúplex de miARN se disocia y la hebra guía es retenida, mientras que la hebra pasajera es degradada.

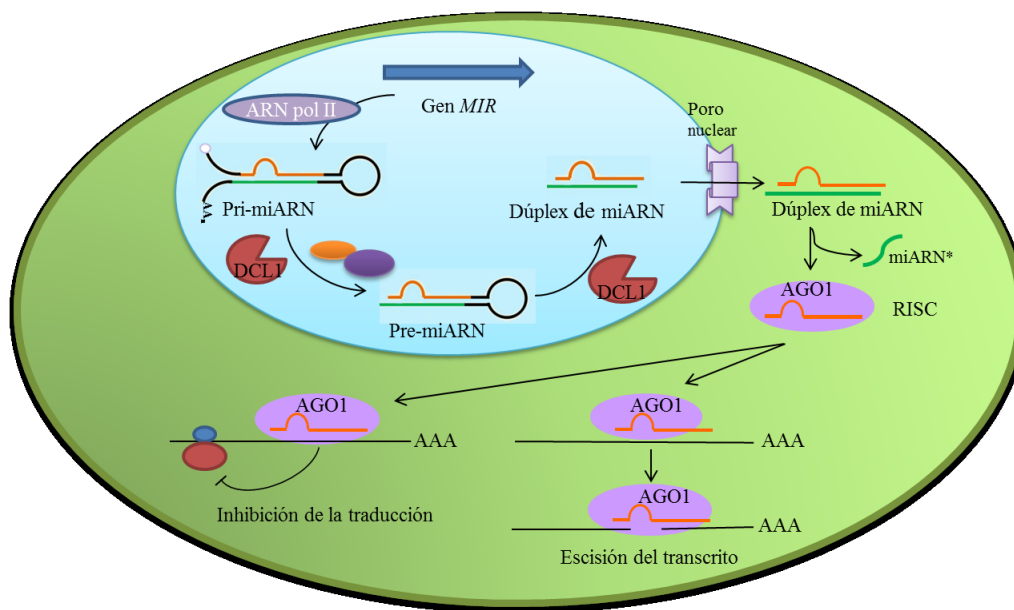


Figura 2: Biogénesis de miRNAs en plantas. Se representa la vía canónica de producción de miRNAs y su modo de acción. *ARN pol II*: ARN polimerasa II; *AGO1*: ARGONAUTA1; *RISC* Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN

Finalmente, la hebra seleccionada conduce el complejo RISC hacia el ARNm blanco que tiene complementariedad de bases con el miARN. Generalmente se produce la rotura endonucleolítica del ARNm por acción de la actividad de AGO, aunque también hay ejemplos que demuestran que los miARNs causan represión traduccional (Yamaguchi y Abe, 2012; Spanudakis y Jackson, 2014).

1.3.1 El rol de los microARNs en la regulación de la expresión génica.

En las plantas, los genes blanco de los miARNs codifican mayormente para factores de transcripción, por lo que los miARNs ocupan un rol central en varias redes regulatorias. Estos factores de transcripción están involucrados en la diferenciación celular, el desarrollo y morfología de la planta, las transiciones de fase durante el ciclo de vida de la planta y en los procesos que involucran señalización por hormonas. Además, diversos estudios han demostrado que los miARNs están involucrados en la respuesta a estreses abióticos (Sunkar, 2009; Sun, 2012)

1.3.2 El rol de los microARNs en el desarrollo

Las plantas superiores sufren una serie discreta de transiciones de fase a lo largo de su vida. A medida que la planta crece, experimenta la transición de fase juvenil a fase adulta durante el crecimiento vegetativo y entonces atraviesa otro

cambio a fase reproductiva, que en angiospermas está caracterizada por la producción de flores. En *Arabidopsis*, el cambio de fase vegetativo está caracterizado por varios cambios morfológicos, entre ellos la forma y tamaño de la hoja y la producción de tricomas abaxiales; de hecho, la producción de tricomas en la superficie abaxial de la hoja se usa frecuentemente como marcador del cambio de fase vegetativo. Sin embargo, los cambios más prominentes ocurren durante la transición de fase vegetativa a reproductiva con la producción de flores (Wu y col., 2009; Zhu y Helliwell, 2011).

Los microARNs regulan directamente tanto la sincronización de estas transiciones como la expresión de ciertos rasgos morfológicos a través de la expresión de factores de transcripción. Se ha demostrado que varias familias de miARNs tienen un papel importante en las rutas que regulan la floración, ya sea para reprimir o promover la transición a fase reproductiva. De gran importancia son los microARNs miR156 y miR172 ya que sus actividades controlan ambos cambios de fase, de juvenil a adulto durante el crecimiento vegetativo y el cambio de fase vegetativa a reproductiva (Yamaguchi y Abe, 2012; Spanudakis y Jackson, 2014).

1.3.3 La familia de miR156 y sus genes blanco

miR156 es uno de los miARNs evolutivamente más conservados en plantas (Wang, 2014). En *Arabidopsis*, la familia de miR156 está compuesta por 10 miARNs (miR156a-j); miR156a-f tienen secuencias de nucleótidos idénticas, mientras que las secuencias nucleotídicas de miR156g-j difieren en uno o dos nucleótidos respecto de los anteriores (Figura 3A). Sin embargo, todos los miembros de la familia se unen al mismo sitio de unión, específico de miR156, en sus ARNm blanco y disminuyen los niveles de expresión por escisión del transcripto (Bari y col, 2013; Wang, 2014). Los genes blanco de miR156 en *Arabidopsis* codifican 10 factores de transcripción, pertenecientes a una familia de 16 miembros, denominados SQUAMOSA PROMOTER BINDING LIKEs (SPLs) (Wang, 2014; Xu y col., 2016). La característica distintiva de esta familia génica es la caja SBP (Figura 3A), que codifica un dominio conservado de 76 aminoácidos denominado dominio SBP, responsable de la interacción con el ADN (Sunkar, 2009). Tanto *SPL9* como *SPL10* son genes que codifican para factores de transcripción y son blancos de miR156, cuyo sitio de unión se localiza corriente abajo de la caja SBP dentro de una región codificante poco conservada (Rhoades y col., 2002; Gandikota y col., 2007).

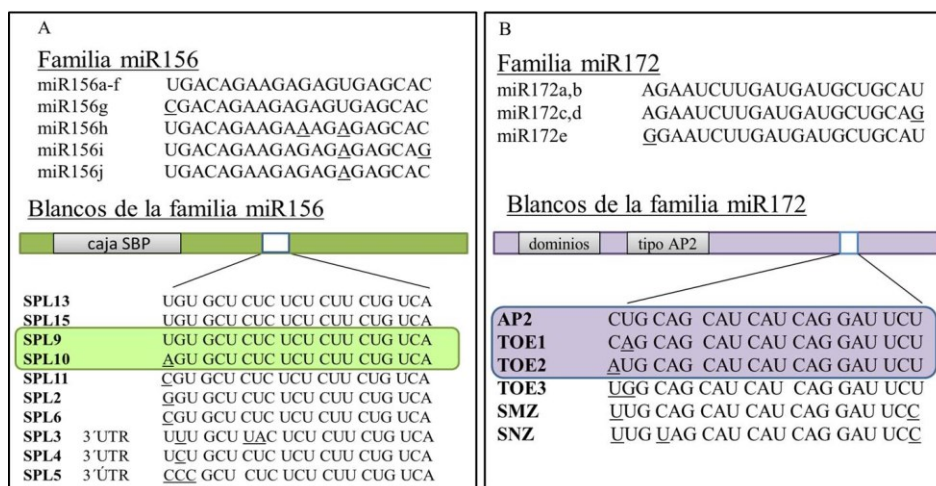


Figura 3: Familias miR156 y miR172 y sus sitios de unión. A) Variabilidad de secuencia de miR156 y sus sitios de unión en SPLs. B) Variabilidad de secuencia de miR172 y sus sitios de unión en genes tipo AP2. Los nucleótidos subrayados representan variaciones respecto de la primera secuencia. La barra sólida representa el ORF de los genes blanco, la barra sin colorear representa el sitio de unión del miRNA. Los genes blanco destacados son los que se analizan en el presente trabajo. Las secuencias se indican en dirección 5'→3'

1.3.4 La familia de miR172 y sus genes blanco

De la misma manera que miR156, miR172 constituye una familia altamente conservada en plantas. El genoma de Arabidopsis contiene 5 *loci* que generan especies de miR172, *MIR172A-MIR172E*. Las variaciones de secuencia se localizan en los nucleótidos terminales, tanto el par miR172c y d, idéntico entre sí, como miR172e difieren en un solo nucleótido respecto del par miR172a y b, también idéntico entre sí (Figura 3B). En Arabidopsis, los blancos de miR172 son los transcritos de 6 genes tipo APETALA2 (AP2): *AP2*, *TARGET OF EAT1 (TOE1)*, *TOE2*, *TOE3*, *SCHLAFMÜTZE (SMZ)* y *SCHNARCHZAPFEN (SNZ)*. El sitio de unión de miR172 está localizado en la región codificante cercano al extremo 3', corriente abajo de dos dominios AP2. El dominio AP2 es un motivo de aproximadamente 60 aminoácidos que se une al ADN preferentemente en motivos ricos en GC (Sunkar, 2009; Zhu y Helliwell, 2011). Estos blancos actúan como represores y son silenciados por miR172 principalmente por inhibición de la traducción, aunque también se ha visto que puede escindir el transcrito (Aukerman y Sakai, 2003).

1.3.5 El rol de miR156 y miR172 en las transiciones de fase del desarrollo

Mientras que los niveles de miR156 disminuyen a medida que la planta envejece, la expresión de miR172 aumenta progresivamente (Figura 4). Este patrón de expresión temporal opuesto es la base de dos cambios de fase: de juvenil a adulto durante el crecimiento vegetativo y el cambio de fase vegetativa a reproductiva (Huijser y Schmid, 2011; Yamaguchi y Abe, 2012; Spanudakis y Jackson, 2014).

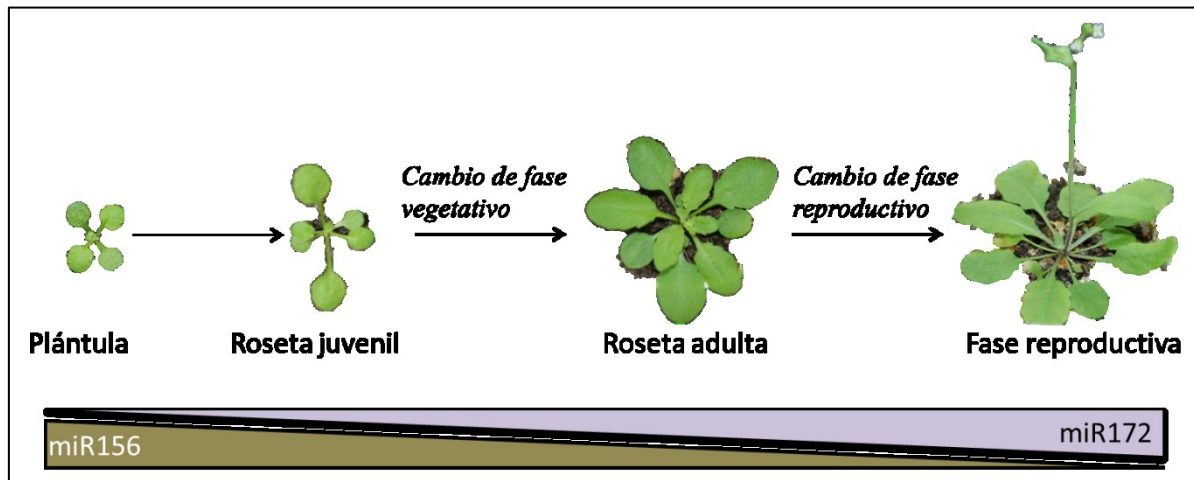


Figura 4: Cambios de fase en el desarrollo de Arabidopsis: en las fases tempranas de desarrollo los niveles de miR156 son elevados, lo que promueve el crecimiento vegetativo juvenil en las plántulas. A medida que la planta madura los niveles de miR156 disminuyen y aumenta el de miR172 lo que resulta en la floración. *Las figuras no se representan a escala.*

En Arabidopsis, la expresión de miR156 es alta en estadios tempranos del desarrollo, lo cual es necesario y suficiente para que ocurra la fase juvenil. La disminución de los niveles de miR156 dependiente de la edad es acompañada por el aumento en la expresión de un grupo de SPLs, los cuales tienen distintas funciones necesarias para el cambio de fase vegetativo (Wu y col., 2009; Zhu y Helliwell, 2011). Se ha demostrado que SPL9 y SPL10 promueven muchos de los atributos asociados con la fase adulta. Por otro lado, SPL9 aumenta el nivel de *FT* y promueve la expresión de *SOC1*, y de dos de los genes de identidad del meristema floral, *AP1* y *LFY* (Wang y col, 2009; Aung y col, 2015).

Sucesivamente, *MIR172B* es activado por SPL9 y SPL10 quienes se unen directamente a su región reguladora e inducen su expresión (Wu y col., 2009). miR172 promueve la transición de fase juvenil a adulta reprimiendo a sus blancos, los cuales regulan transcripcionalmente a los genes *SPL3/4/5* independientemente

de miR156 (Jung y col., 2011). Además, a medida que pasa el tiempo y se acumula miR172, disminuye el nivel de las proteínas AP2-like, lo que resulta en la inducción de la floración (Aukerman y Sakai, 2003; Spanudakis y Jackson, 2014).

1.3.6 El rol de la ruta de la edad en la respuesta a UV-B

Como se ha mencionado previamente, altos niveles de radiación UV-B inducen respuestas a estrés inespecíficas en plantas no aclimatadas, mientras que bajos niveles dan lugar a respuestas fotomorfogénicas aclimatando a la planta sin ningún signo de estrés (Vanhaelewyn y col., 2016). Estas respuestas incluyen cambios en los niveles de expresión génica (Casati y col., 2005; Casati, 2013). Se ha visto que la radiación UV-B afecta los niveles de múltiples miARNs en *Arabidopsis* y en *Populus tremula* (Sunkar, 2009; Casati, 2013) y existen evidencias que sugieren que los miARNs podrían ejercer un rol regulatorio importante en la respuesta morfogénica (Casadevall y col., 2013). En *Arabidopsis*, se ha observado que los niveles miR156 y miR172 son afectados por la exposición a UV-B (Zhou y col., 2007). En maíz, luego de la exposición a UV-B, miR172 disminuye su expresión, con un correspondiente aumento de sus genes blanco, sugiriendo un retraso en la transición entre crecimiento vegetativo y reproductivo, probablemente para permitir la reparación de daños al ADN inducidos por UV-B, o para permitir la aclimatación a condiciones de crecimiento bajo mayor irradiación UV-B (Casati, 2013). Sin embargo, aún se desconoce cómo los cambios inducidos por UV-B en la expresión de estos dos miARNs afectan los procesos biológicos regulados por ellos.

El proyecto del cual forma parte este trabajo de tesina tiene como finalidad avanzar en el conocimiento a nivel molecular de los cambios inducidos por UV-B en el tiempo de floración de *Arabidopsis*. Dada la escasa información disponible acerca de este aspecto de la regulación del tiempo de floración, se ha propuesto caracterizar la influencia de la luz UV-B sobre las diversas rutas genéticas que determinan el tiempo de floración en *Arabidopsis*. En particular, este trabajo se enfocó sobre la ruta de la edad y la posible influencia de la luz UV-B sobre sus principales componentes. Con este fin, se analizó la influencia de la luz UV-B sobre la expresión de miR156, miR172 y de sus correspondientes blancos; y estos resultados se complementaron con ensayos para estudiar el tiempo de floración en plantas de *Arabidopsis* salvajes y en plantas transgénicas o mutantes en componentes de esta ruta, expuestas a dosis diarias de luz UV-B.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Estudiar la influencia de la radiación UV-B sobre el tiempo de floración en *Arabidopsis*. Determinar si la ruta de la edad participa en la respuesta a radiación UV-B.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar si la radiación UV-B modifica el tiempo de floración de plantas de *Arabidopsis* en las condiciones de trabajo.
- Analizar el efecto de la radiación UV-B sobre los niveles de expresión de miR156 y miR172 y de sus genes blanco *SPL9/SPL10* y *TOE1/TOE2/AP2*.
- Comprobar los fenotipos y genotipos de las líneas sobreexpresantes y mutantes en componentes de la ruta de la edad, para su utilización en estudios posteriores.
- Analizar el efecto de la radiación UV-B sobre el tiempo de floración en plantas mutantes *sp19-4*, dobles mutantes *toe1-2/toe2-1* y sobreexpresantes de miR156 y miR172.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Se utilizaron plantas salvajes y plantas de diferentes líneas transgénicas y mutantes de *Arabidopsis* pertenecientes al ecotipo Columbia (Col-0). Todas ellas fueron gentileza del Dr. Scott Poethig (Universidad de Pensilvania, EE.UU) y se detallan en la Tabla I.

Tabla I: Material vegetal utilizado en el presente trabajo

Nombre	Descripción	Origen
Col-0	Salvaje	
<i>spl9-4</i>	Mutante por inserción de ADN-T	SAIL_150_B05 (Wu y col., 2009)
<i>toe1-2/toe2-1</i>	Doble mutante por inserción de ADN-T obtenida por cruzamiento de dos líneas mutantes	SALK_069677 SALK_065370 (Aukerman y Sakai, 2003)
<i>miR156ox</i>	Línea sobreexpresante del gen <i>MIR156A</i> , expresado bajo el control del promotor CaMV35S	(Wu y col., 2009)
<i>miR172ox</i>	Línea sobreexpresante del gen <i>MIR172B</i> , expresado bajo el control del promotor CaMV35S	(Aukerman y Sakai, 2003)

3.2 Condiciones de crecimiento

Las semillas se sembraron en macetas de 150 ml conteniendo tierra previamente esterilizada y, luego de estratificar a 4°C durante 3 días, se transfirieron a la cámara de cultivo. Las plantas se crecieron bajo luz blanca en condiciones de fotoperiodo de día largo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad, y a temperatura controlada de 23°C.

3.3 Tratamiento con luz UV-B

Para los tratamientos con luz UV-B se suplementó la luz blanca con 2 Wm^{-2} de luz UV-B (311 nm) para un grupo de plantas; mientras que para las plantas control se cubrió la lámpara de luz UV-B con un film de polyester que evita el paso de esta radiación. La intensidad de la radiación recibida por las plantas fue controlada utilizando un detector de radiación UV-B (*Ultraviolet Radiometer* Modelo UV203, Macam Photometrics Ltd., Livingston, Escocia), el cual fue calibrado, según las especificaciones del Laboratorio Nacional de Física de Escocia.

El tratamiento consistió en la irradiación con luz UV-B durante 1 hora diaria a partir del día 9 de crecimiento hasta la floración, considerándose el día en que se transfirieron las plantas a la cámara de cultivo como día 1 de crecimiento.

Se recolectó la parte aérea de entre 10 y 15 plántulas correspondientes a plantas control o tratadas con UV-B, inmediatamente después del primer tratamiento (día 9 de crecimiento, día 1 de tratamiento); luego de 4 días de tratamiento (día 12 de crecimiento); luego de 10 días de tratamiento (día 18 de crecimiento) y después de 17 días de tratamiento (25 días de crecimiento, cuando las plantas control comienzan a presentar el botón floral). Las plántulas fueron congeladas con nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta su posterior utilización.

3.4 Determinación del tiempo de floración

El tiempo de floración se determinó contando el número de hojas de roseta al momento de apertura de la primera flor y/o contando los días de crecimiento hasta el momento de apertura de la primera flor.

3.5 Determinación de la aparición de tricomas abaxiales

La primera hoja con tricomas abaxiales se determinó mediante observación diaria de las hojas de roseta con una lupa estereoscópica binocular hasta la aparición del primer tricoma en la parte reversa de la hoja.

3.6 Extracción de ADN genómico

Se colocó tejido fresco de hojas en tubos de 1,5 ml y luego se trituró finamente mediante el uso de micropistilos. El material se homogeneizó con 500 μl de *buffer* de extracción (Tris-HCl 200mM, pH 7,5; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS

0,5% p/v; (Edwards, Johnstone y Thompson, 1991) y se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 minutos a 15.000 xg. La fase acuosa (fase superior) se transfirió a un nuevo tubo donde se precipitó con igual volumen de isopropanol. Después de centrifugar durante 15 minutos a 8.000 xg y a una temperatura de 4°C, se lavó el precipitado con 500 µl de etanol 70 % v/v frío. Luego de secar a temperatura ambiente, se resuspendió el precipitado en 50 µl de agua destilada.

3.7 Extracción de ARN total

Las extracciones de ARN total se realizaron usando el reactivo *Quick-Zol* (Kalium Technologies). En tubos de 1,5 ml se colocó 100 mg de tejido obtenido como se describió en el punto 3.3 y se trituró con N₂ líquido hasta formar un fino polvo. Una vez pulverizado, se agregó 1 ml de reactivo *Quick-Zol* homogeneizando completamente. Luego de incubar 3 minutos a temperatura ambiente, se agregó 300 µl de cloroformo y se mezcló agitando vigorosamente durante 20 segundos. Posteriormente se centrifugó durante 15 minutos a 4°C a máxima velocidad en microcentrífuga de mesada. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se repitió la extracción con cloroformo. Nuevamente se transfirió la fase acuosa (fase superior) a un tubo limpio y el ARN se precipitó agregando un volumen igual de isopropanol frío. Luego de incubar toda la noche a - 20°C, se centrifugó a 4°C durante 30 minutos a una velocidad de 8.000 xg. El precipitado de ARN se lavó con etanol 70% v/v frío y luego de secar se disolvió en 20 µl de agua destilada estéril libre de ARNasas tratada con DEPC. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

La calidad del RNA se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa 2% p/v (ver punto 3.9), en función de la integridad de las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales.

3.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador TECHNE TC-3000. Se utilizó *GoTaq®* ADN polimerasa termoestable (Promega) con el par de cebadores correspondientes (Tabla II). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 1X *buffer* de reacción (*Green GoTaq®* provisto por el fabricante), dNTPs 200 µM;

cebador directo 0,5 μ M; cebador reverso 0,5 μ M; 0,25 U de ADN polimerasa; 1 μ l de ADN genómico (entre 10 y 50 ng).

El protocolo de amplificación utilizado consistió en una etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de PCR que constaron de una etapa de desnaturalización de 20 segundos a 94°C, una etapa de hibridación de 30 segundos a una temperatura variable según el par de cebadores utilizado (Tabla II) y una etapa de elongación de 30 segundos a 72°C. Finalmente, se completó con una etapa de extensión final de 2 minutos a 72°C. Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en geles de agarosa 1% p/v.

Tabla II: Secuencias de los cebadores empleados en las reacciones de PCR para genotipado

Gen	Locus	Nombre	Secuencia	Tf †
TOE1	AT2G28550	TOE1-F/R	F: TGGGGCAGTTTCTTGGT	52°C
			R: AAGAGCCTCCCATTTTGC	54°C
TOE2	AT5G60120	TOE2-F/R	F: GTGCTGTGATGATGACTAAGGAG	68°C
			R: TGTTTACCGCAATCCCTGCAACC	70°C
SPL9	AT2G42200	SPL94-F/R	F: GTGTTTGTGTTGGACTCGTTGGGC	68°C
			R: CGGAAGCTGATGAAACCTATGTG	72°C
ADN-T	--	LB-SALK	LB: TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	70°C
ADN-T	--	LB-SAIL	LB: TTCATAACCAATCTCGATACAC	60°C

† Tf: temperatura de fusión. Las secuencias de los oligonucleótidos se indican en sentido 5'→3'

3.9 Electroforesis de ácidos nucleicos

Para la visualización de ácidos nucleicos se realizaron geles de agarosa de concentración 1% p/v o 2% p/v según se indica en cada caso, empleando sistema submarino (Sambrook y Russel, 2001). Se disolvió la cantidad adecuada de agarosa en *buffer* TBE 0,5X (Tris 45 mM, EDTA 1 mM, ácido bórico 45 mM) y a continuación se adicionó SYBR® *Safe* 1X (Invitrogen).

En todos los casos, se empleó TBE 0,5X como *buffer* de corrida electroforética y se sembraron marcadores 50 pb o 100 pb (PBL productos Bio-Lógicos) junto con las muestras en estudio, para estimar los tamaños moleculares de las bandas de interés. La intensidad de corriente empleada fue de 100 mA. Una

vez finalizada la electroforesis, los ácidos nucleicos se visualizaron utilizando un transiluminador UV (longitud de onda de trabajo: 302 nm, equipo *BioChem System, UVP Bioimaging Systems*)

3.10 Cuantificación de ARN

La cuantificación de ARN se llevó a cabo empleando un fluorómetro (*Qubit® fluorometer 1.0*, Invitrogen) y los reactivos de ensayo e instrucciones provistos por el fabricante (*Quant-iT™ RNA assay kit*, Invitrogen).

3.11 Tratamiento con ADNasa

Para eliminar el ADN genómico remanente en las muestras de ARN, éstas se trataron con ADNasa libre de ARNasas (*RQ1 RNase-free DNase*, Promega). Se preparó una mezcla de reacción con 3 µg de ARN, 1X *buffer* de la enzima (provisto por el fabricante) y 1U de ADNasa. La mezcla se incubó 30 minutos a 37°C y luego se le agregó 1µl de solución de inactivación de la enzima (*STOP solution*, también provista por el fabricante) y se incubó a 65°C durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo se prosiguió a realizar la reacción de retrotranscripción o se guardó a -20°C hasta su utilización.

3.12 Reacción de retrotranscripción

Para analizar los niveles de acumulación de los miARNs maduros de interés, se utilizó la técnica denominada ***Stem-Loop qRT-PCR***, empleando la transcriptasa reversa *SuperScript II™ RT* (Invitrogen), y oligonucleótidos del tipo *stem-loop* además de oligodT (*anchored Oligo(dT)₂₀*, Invitrogen). El oligo *stem-loop* tiene dos partes: el componente de tallo-burbuja y una secuencia corta en su extremo 3' cuya secuencia es la reversa complementaria de la secuencia en el extremo 3' del miARN que le da la especificidad (Tong y col., 2015). Esta secuencia es excluida del cebador específico directo que se usa luego para amplificar.

Brevemente, la técnica consiste en la hibridación del oligo *stem-loop* (SLO) con la molécula de miARN en su extremo 3' para guiar la retrotranscripción; de esta manera, la síntesis de la primera hebra de ADNc con un SLO aumenta la longitud del producto. A continuación, el producto de la retrotranscripción es amplificado por PCR en tiempo real usando un cebador directo específico para el miARN y un

cebador reverso que es complementario a una secuencia dentro del SLO (Varkonyi-Gasic y col., 2007; Kramer, 2011). Se trabajó siguiendo las indicaciones del fabricante de la enzima, junto con las modificaciones establecidas en el protocolo detallado por Varkonyi-Gasic (Varkonyi-Gasic y col., 2007). Se preparó una mezcla de reacción conteniendo 3 µg de ARN tratado con ADNasa, 1 µg de oligodT y 0,5 mM de cada uno de los SLO específicos para miR156 y miR172 (Tabla III), y se incubó a 65°C durante 10 minutos. Luego se agregó *buffer* de la enzima 1X (*First Strand Buffer*, Invitrogen), DTT 0,01M, dNTPs 0,5 mM y 100U de la enzima. Asimismo, se realizaron reacciones con idéntica composición, excepto que no se agregó enzima (-RT). Utilizando un termociclador *Applied Biosystems Veriti* se obtuvo el ADNc usando el siguiente protocolo: primera etapa de 30 minutos a 16°C; una segunda etapa consistente en 60 ciclos de 30 segundos a 30°C, 30 segundos a 42°C y 1 segundo a 50°C. Finalmente, se eleva la temperatura hasta 85°C durante 5 minutos para inactivar la enzima (Varkonyi-Gasic y col., 2007) y se almacenan las muestras a -20°C hasta su utilización.

Tabla III: Stem-Loop oligonucleótidos específicos

Nombre	Secuencia †
mir156SL	<u>GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAA</u> <u>CGTGCT</u>
mir172SL	<u>GTTGGCTCTGGTGCCACGTGCTTCGATTCGCACCAGAGCCAA</u> <u>CMTGCA</u>

† Las secuencias subrayadas son complementarias y forman el tallo (*stem*). Las secuencias resaltadas corresponden al sitio de unión del cebador reverso. M indica A o C. Se muestra la secuencia en sentido 5'→3'

3.13 PCR en tiempo real (qRT-PCR)

En las reacciones de PCR en tiempo real se utilizaron los oligonucleótidos específicos para cada gen detallados en la Tabla IV, los cuales fueron diseñados u obtenidos de reportes previos.

Las reacciones se llevaron cabo en un termociclador *Stratagene Mx300P qPCR* (Agilent). Para la amplificación se utilizó como molde el ADNc obtenido como se detalló en el punto 3.12, *buffer* de la enzima 1X (ADN polimerasa *Taq*

Platinum™); 3mM MgCl₂; 0,2 mM dNTPs; 0,5X SYBR® Green; 0,5 U de *Taq Platinum™*; y 0,5 µM de los oligonucleótidos directo y reverso en un volumen final de 20 µl. El protocolo de amplificación consistió en un segmento inicial de activación de la ADN polimerasa a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación compuestos por tres pasos: 10 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C o 55°C y 30 segundos a 72°C. Por último un tercer segmento correspondiente a la curva de disociación, donde se midió la disminución de la fluorescencia al aumentar la temperatura de 65°C a 98°C. La especificidad de los oligonucleótidos se estudió mediante el análisis de la curva de fusión y mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% p/v para verificar que los tamaños obtenidos sean los esperados. Los niveles de expresión génica se normalizaron usando el gen *CALCIUM DEPENDENT PROTEIN KINASE3 (CPK3)*, cuya expresión no cambia por exposición a UV-B (Ulm y col., 2004). Para cada muestra se realizaron 3 réplicas biológicas y 3 réplicas técnicas.

Tabla IIV: secuencia de oligonucleótidos usados para la qPCR

Blanco	Secuencia †	
	Oligonucleótido Directo	Oligonucleótido reverso
miR156	GCGGCGTGACAGAAGAGAGTG	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR172	CGGCGGGAATCTTGATGATGC	GTGCCCACGTGCTTCCG
SPL9	CTTGTCTTTGCATCAGAGAATC	AATCTGATCTCATAACTTGG
SPL10	AGTCGGGTGTCATCATCCGATG	GTTGTCATACCAACAGAATCC
TOE1	TGGGGCAGTTTCTTGGT	AAGAGCCTCCCATTTTGC
TOE2	CCCATGGAAAGAACACCA	TTGACGAAGGGCTGAGAA
AP2	AATGGCTTCCAACCTCCT	ACCGATGGAGGGAAAAAG
CPK3	AGCTGCGGAAGTGCTAAATC	CGGTTCTCAATTCCTCCAAG

† Las secuencias de los oligonucleótidos directo y reversos se indican en sentido 5'→3'

Para validar la linealidad del ensayo, la eficiencia de la amplificación de los genes de interés y de referencia se determinó mediante la realización de diluciones seriadas de las muestras y la determinación de los valores de Ct para cada dilución. Así, se confirmó que las eficiencias de amplificación eran aproximadamente iguales

en todos los casos y se utilizó el método de comparación de Ct (Schmittgen y Livak, 2008)

3.14 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando la prueba *t-Student* y las diferencias significativas se indican con * para $P < 0.05$ y con ** para $P < 0.01$. Los gráficos fueron realizados utilizando Microsoft Excel.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Efectos de la luz UV-B en Arabidopsis

Con el objetivo de estudiar los efectos de la radiación UV-B sobre el tiempo de floración de Arabidopsis, las plantas fueron sometidas a dosis diarias de radiación UV-B, según se detalla en el punto 3.3.

Se observó que las plantas salvajes del ecotipo Col-0, tratadas con luz UV-B presentaron un retraso en el tiempo de floración de aproximadamente 2 días respecto de las plantas control que no fueron expuestas a luz UV-B (Figura 5 A y B).

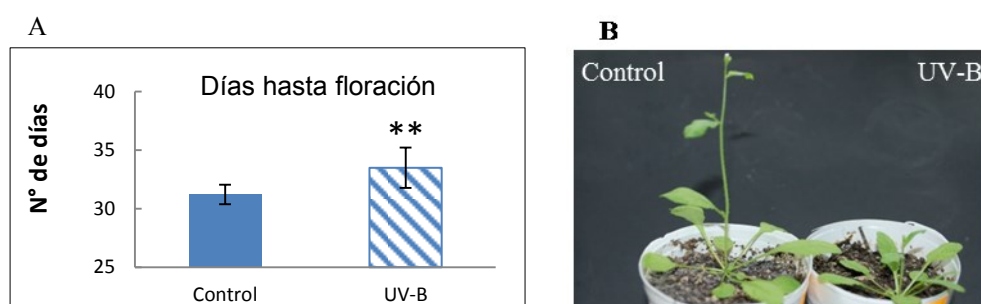


Figura 5: Efecto de la luz UV-B en el tiempo de floración de plantas Col-0. A) Número de días hasta floración en condiciones control y tratadas con UV-B. Se representa promedio \pm desviación estándar. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto de las plantas salvajes (** = $P < 0.01$, $n \geq 10$). B) Individuos representativos de plantas Col-0 control y tratada con UV-B a los 31 días de crecimiento.

4.2 Papel de la ruta de la edad en el retraso de la floración causado por la radiación UV-B

Para estudiar si la ruta de la edad está involucrada en el retraso del tiempo de floración causado por la luz UV-B en plantas de Arabidopsis, se analizaron los niveles de expresión de componentes de esta ruta en plantas salvajes crecidas bajo la influencia de UV-B. Además se analizó el tiempo de floración, expresado como días hasta floración, en líneas de plantas transgénicas y mutantes en componentes de esta ruta, sometidas a tratamientos con UV-B.

4.2.1 Efecto de la radiación UV-B sobre la expresión de los componentes de la ruta de la edad

La cuantificación de microARNs maduros requiere de técnicas especiales debido a su pequeño tamaño y a la falta de una secuencia común como la cola de poliA en los ARNm. Una de estas técnicas se basa en la retrotranscripción con oligonucleótidos *Stem-loop* seguida de cuantificación por PCR en tiempo real. Los oligonucleótidos *Stem-loop* contienen una secuencia corta complementaria al extremo 3' del miARN que guían la retrotranscripción para convertir el miARN en ADNc de mayor longitud (Shen y col, 2010).

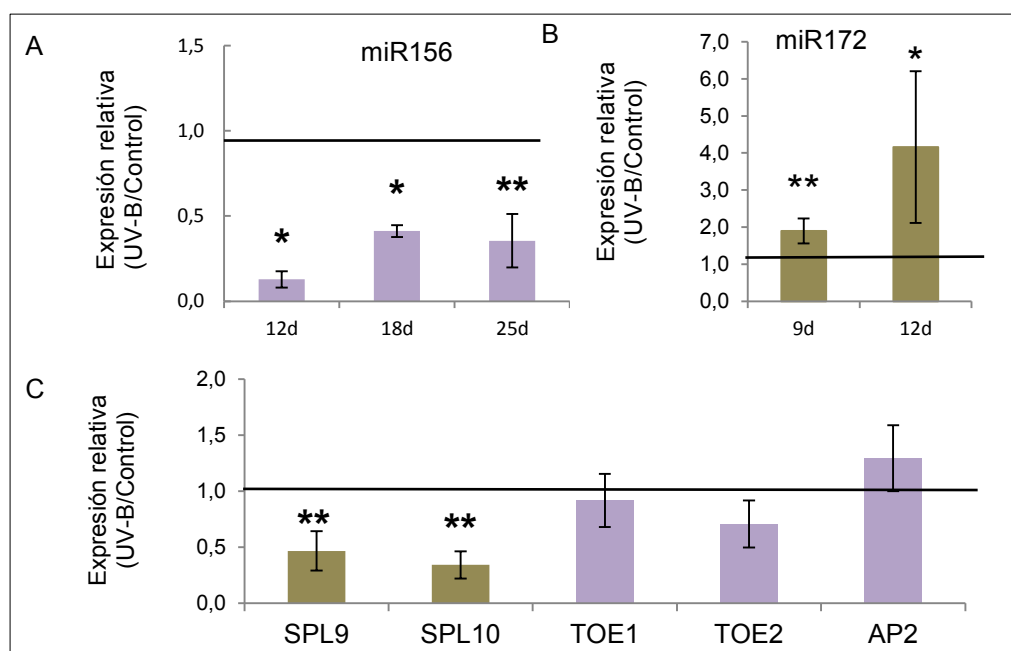


Figura 6: Efecto de la radiación UV-B sobre la ruta de la edad. A) Expresión relativa de miR156 en plantas control y tratadas con UV-B analizadas por SLO qRT-PCR en diferentes puntos del crecimiento de plantas salvajes. B) Expresión relativa de miR172 en plantas control y tratadas con UV-B analizadas por SLO qRT-PCR en diferentes puntos del crecimiento de plantas salvajes. C) Expresión relativa de *SPL9* y *SPL10*, genes blanco de miR156 y de *AP2*, *TOE1* y *TOE2*, genes blanco de miR172, a los 12 días de crecimiento. Se representan los niveles relativos de transcritos de cada gen en plantas tratadas con UV-B normalizados a plantas control, usando *CPK3* como gen de referencia (promedio \pm desviación estándar, * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$).

Teniendo en cuenta que la expresión de miR156 disminuye a medida que la planta avanza en la fase juvenil hacia la adulta (Wu y Poethig, 2006; Wang y col, 2009), se midió el nivel de miR156 en plantas Col-0 luego de 9 días de crecimiento (inmediatamente después del primer día de tratamiento con UV-B) y no más allá de

los 12 días de crecimiento ya que su acumulación se torna difícil de detectar; mientras que el nivel de miR172 se analizó a los 12, 18 y 25 días de crecimiento, ya que su nivel aumenta a medida que disminuye el de miR156 (Wu y Poethig, 2006). Se determinó que el nivel de acumulación de miR156 es mayor en plantas tratadas con UV-B (Figura 6A) y que el nivel de miR172 disminuye en plantas que crecieron bajo la influencia de esta radiación en todos los puntos analizados (Figura 6B).

Asimismo, utilizando plantas de 12 días de crecimiento, se analizaron los cambios en la expresión de *SPL9* y *SPL10*, dos de los genes regulados por miR156 y de *TOE1*, *TOE2* y *AP2*, tres de los genes regulados por miR172. Se observó que los niveles de *SPL9* y *SPL10* son menores en plantas tratadas con UV-B. Por su parte, no se observaron diferencias en los niveles de expresión de los genes *TOE1*, *TOE2* y *AP2* regulados por miR172 en plantas tratadas con UV-B (Figura 6C).

4.2.2 Efecto de la radiación UV-B sobre la aparición de tricomas abaxiales

La aparición de tricomas abaxiales es una de las primeras características detectadas en hojas de roseta que indica la transición de fase juvenil a adulta, la cual está regulada por miR156 (Wu y Poethig, 2006; Wu y col., 2009). Por lo tanto, analizamos si la radiación UV-B resulta en una fase juvenil prolongada como consecuencia del aumento en los niveles de miR156. Para esto analizamos la aparición del primer tricoma abaxial y determinamos que en plantas tratadas con UV-B la primera hoja con tricomas abaxiales se retrasa de la hoja 6 ($6,30 \pm 0,45$) para plantas control a la hoja 8 ($8,40 \pm 0,50$) en plantas tratadas con UV-B, indicando que en las plantas irradiadas con UV-B la fase juvenil se encuentra efectivamente extendida con respecto a las plantas sin irradiar (Figura 7).

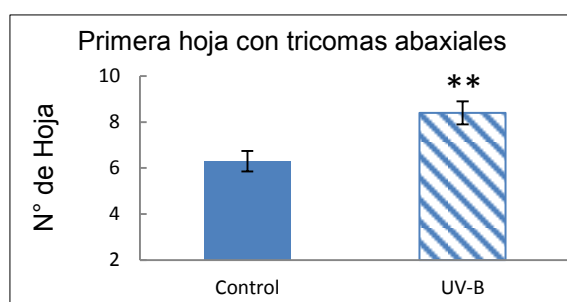


Figura 7: Aparición de tricomas abaxiales. Número de hoja en que aparece el primer tricoma abaxial en condiciones control y tratadas con UV-B. *Se representa el promedio \pm desviación estándar. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto de las plantas control (** = $P < 0.01$, $n \geq 10$).*

4.3 Caracterización fenotípica de las líneas mutantes y transgénicas

A continuación, y con el fin de seguir analizando el papel de la ruta de la edad en el retraso de la floración observado en plantas irradiadas, plantas de líneas mutantes y transgénicas sobreexpresantes en genes pertenecientes a esta ruta se sometieron al mismo tratamiento con UV-B.

Para verificar los *stocks* de semillas cedidos por grupos colaboradores y para generar cantidades suficientes de semillas a utilizar en los ensayos posteriores, se realizó la caracterización fenotípica del tiempo de floración en las líneas mutantes y transgénicas en componentes de la ruta de la edad. Para esto se determinó el número de hojas de roseta y el número de días hasta floración para cada una de las líneas en comparación con plantas salvajes del ecotipo Col-0 como control (Tabla V).

Tabla V: Tiempo de Floración.

Genotipo	Hojas de roseta [†]	Días hasta floración [†]
Col-0	10.36 ± 1.22	29.00 ± 2.18
<i>miR156ox</i>	29.22 ± 2.91 **	46.56 ± 4.30 **
<i>spl9-4</i>	12.43 ± 0.85 **	31.79 ± 2.52 **
<i>miR172ox</i>	5.80 ± 0.42 **	24.80 ± 0.79 **
<i>toe1-2/toe2-1</i>	5.42 ± 0.51 **	24.42 ± 0.90 **

[†]Se expresa el número de hojas de roseta y de días hasta floración como promedio ± desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de las plantas salvajes (** = $P < 0.01$, $n \geq 10$)

4.3.1 Línea sobreexpresante *miR156ox*

La línea *miR156ox* es una línea transgénica que expresa constitutivamente el gen *MIR156A* bajo control del promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV35S) (Wu y col., 2009). El número de hojas de roseta fue aproximadamente 3 veces mayor respecto de las plantas Col-0; de manera similar, el número de días hasta floración fue aproximadamente 1.5 veces mayor para las plantas sobreexpresantes respecto de Col-0 (Figura 8, Tabla V). En la Figura 8 se muestran individuos representativos de plantas Col-0 y *miR156ox*, comparando el fenotipo de plantas de 3 semanas (Figura 8A) y de 5 semanas de edad (Figuras 8B y C). En las Figuras 8B y C se muestran vistas alternativas de una planta Col-0 que ha

alcanzado la floración en contraposición a la planta *miR156ox*. De esta manera, se verificó el fenotipo esperado para esta línea, de acuerdo a datos bibliográficos que indican que la expresión constitutiva de *MIR156A* resulta en un retraso de la floración (Wang y col., 2009).



Figura 8. Tiempo de floración en plantas Col-0 y *miR156ox*. Hojas de roseta y floración en plantas Col-0 y *miR156ox*. A) Plantas de 3 semanas de edad. B) Plantas de 5 semanas de edad. C) Vista alternativa de B.

4.3.2 Línea mutante *spl9-4*

La línea *spl9-4* corresponde a una mutante por inserción de ADN-T de la colección SAIL (SAIL_150_B05) que ha sido descrita previamente (Wu y col., 2009; Xu y col., 2016). El número de hojas de roseta y el número de días hasta floración fueron significativamente mayores que los de las plantas salvajes (Figura 9, Tabla V). En este caso, las plantas mutantes *spl9-4* produjeron aproximadamente 2 hojas de roseta más y florecieron casi 3 días más tarde que las plantas Col-0.

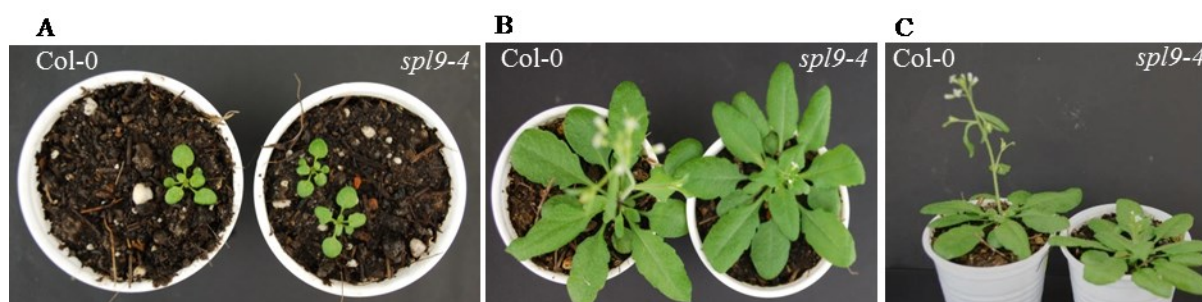


Figura 9. Tiempo de floración en plantas Col-0 y *spl9-4*. Hojas de roseta y floración de plantas Col-0 y *spl9-4*. A) Plantas de 2 semanas de edad. B) Plantas de 4 semanas de edad. C) Vista lateral de B.

En la Figura 9 se muestran individuos representativos de las plantas Col-0 y *spl9-4*, donde se compara el fenotipo de plantas de 2 semanas (Figura 9A) y de plantas en floración vistas desde arriba (Figuras 9B) y desde una vista lateral (Figura 9C). Se muestra que la planta Col-0 presenta numerosas flores cuando recién

comienza la floración en *sp/9-4*. Por lo tanto, también para la línea *sp/9-4* el tiempo de floración se retrasó respecto de la línea salvaje, tal como lo indica la bibliografía (Xu y col., 2016) (Tabla V).

4.3.3 Línea sobreexpresante *miR172ox*

La línea *miR172ox* es una línea transgénica que expresa el gen *MIR172B* constitutivamente bajo control del promotor CaMV35S y ha sido descrita previamente (Aukerman y Sakai, 2003). El número de hojas de roseta al igual que el número de días hasta floración fueron significativamente menores respecto de las plantas Col-0. Las plantas sobreexpresantes generaron cerca de 6 hojas de roseta y florecieron aproximadamente 4 días antes que las plantas salvajes (Figura 10, Tabla V). En la Figura 10 se muestran individuos representativos de las plantas Col-0 y *miR172ox*, comparando el fenotipo de plantas de 2 semanas (Figura 10A) y de 3 semanas de edad (Figuras 10B y C), donde se pone de manifiesto que las plantas *miR172ox* presentan una floración temprana con respecto de las plantas Col-0 control. Por lo tanto, se verificó que las plantas de la línea *miR172ox* presentan floración temprana respecto de las plantas salvajes, en concordancia con los datos bibliográficos que indica que la expresión constitutiva del gen *MIR172* adelanta la floración. (Aukerman y Sakai, 2003; Jung y col., 2011).

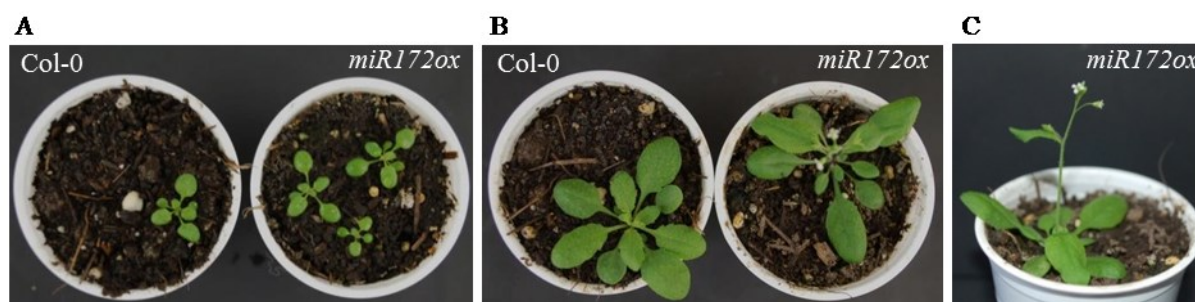


Figura 10: Tiempo de floración de plantas Col-0 y *miR172ox*. Hojas de roseta y floración de plantas Col-0 y *miR172ox*. A) Plantas de 2 semanas de edad. B) Plantas de 3 semanas de edad. C) Vista lateral de la planta *miR172ox* mostrada en B.

4.3.4 Línea doble mutante *toe1-2/toe2-1*

La doble mutante *toe1-2/toe2-1* se obtuvo por cruzamiento de dos líneas con inserciones de ADN-T en los genes TOE1 (SALK_069677) y TOE2 (SALK_065370) (Aukerman y Sakai, 2003)

El número de hojas de roseta y el número de días hasta floración disminuyeron de manera significativa para la doble mutante respecto de las plantas Col-0. Las plantas de esta línea proporcionaron cerca de 5 hojas de roseta y florecieron en promedio 4 días antes que las plantas salvajes (Figura 11, Tabla V). En la Figura 11 se muestran individuos representativos de las plantas Col-0 y *toe1-2/toe2-1*, comparando el fenotipo de plantas de 2 semanas (Figura 11A) y de 3 semanas de edad (Figuras 11B y C), donde se evidencia la floración temprana de las plantas *toe1-2/toe2-1* con respecto a las plantas Col-0 control. De esta manera, se verificó el fenotipo descrito previamente de las plantas *toe1-2/toe2-1* (Aukerman y Sakai, 2003; Jung y col., 2011).

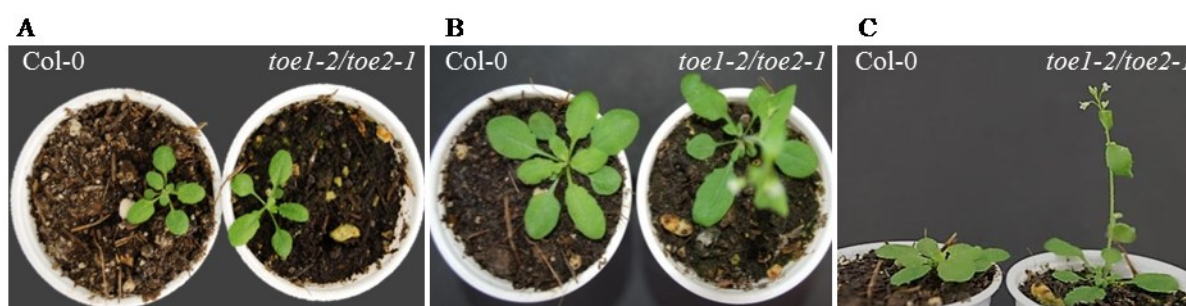


Figura 11. Tiempo de floración de plantas Col-0 y *toe1-2/toe2-1*. Hojas de roseta y floración de plantas Col-0 y *toe1-2/toe2-1*. A) Plantas de 2 semanas de edad. B) Plantas de 3 semanas de edad. C) Vista lateral de las plantas mostradas en B.

4.4 Caracterización genotípica de las plantas mutantes.

El genotipo de las líneas con inserciones de ADN-T se determinó mediante PCR, utilizando el ADN genómico como molde y combinaciones de oligonucleótidos. Se emplearon cebadores específicos para el gen en estudio (directo y reverso) y un cebador LB que hibrida en un extremo del ADN-T: LB-SAIL o LB-SALK según corresponda (Tabla II). Se extrajo ADN genómico de hojas de plantas adultas según se indica en el punto 3.5, y luego se realizaron dos reacciones de PCR por cada muestra. Para la primera reacción se combinaron los oligonucleótidos directo y reverso específicos de cada gen; mientras que para la segunda se combinó uno de los oligonucleótidos específicos (directo o reverso, según el caso) con el oligonucleótido LB que hibrida sobre el ADN-T.

4.4.1 Genotipado de plantas de la línea *sp/9-4*

En la Figura 12A se representa el gen *SPL9* con el sitio de inserción del ADN-T y los sitios de hibridación de los oligonucleótidos. Se usaron SPL94-F y SPL94-R como oligonucleótidos directo y reverso, respectivamente, que hibridan con secuencias flanqueantes al sitio de inserción del ADN-T; mientras que LB-SAIL fue utilizado para hibridar con el borde izquierdo del ADN-T (Tabla II). Usando los cebadores directo y reverso se observó un único producto de amplificación para un individuo salvaje Col-0 (Figura 12B) y ninguna banda de amplificación para las plantas mutantes. Por su parte, utilizando la combinación de cebadores SPL94-F y LB-SAIL, se observó un único producto del tamaño esperado para las plantas mutantes y no se obtuvo banda de amplificación para Col-0 (Figura 12C). De esta manera se verificó que las plantas analizadas son homocigotas para la inserción y se utilizaron estas plantas para obtener semillas *sp/9-4* a utilizar en experimentos posteriores.

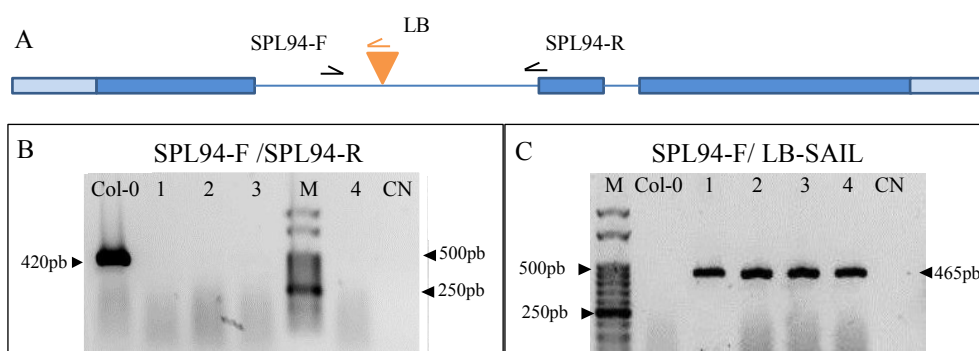


Figura 12. Caracterización genotípica de la mutación *sp/9-4*. A) Localización de la inserción de ADN-T y de los sitios de hibridación de los cebadores en el gen *SPL9*. Las barras sólidas representan los exones, las flechas representan los cebadores y el triángulo indica la inserción de ADN-T. Las representaciones no son a escala. SPL94-F y SPL94-R son los cebadores específicos del gen directo y reverso, respectivamente; LB es el cebador que hibrida en el ADN-T. B) Análisis de los productos de amplificación de plantas salvajes y mutantes *sp/9-4* usando cebadores específicos del gen y C) usando la combinación SPL94-F y LB-SAIL. Col-0: planta salvaje; Calles 1-4: plantas *sp/9-4*, M: marcador de peso molecular 50 pb; CN: control negativo sin ADN.

4.4.2 Genotipado de plantas de la línea *toe1-2/toe2-1*

En el caso de las dobles mutantes *toe1-2/toe2-1* se caracterizaron las inserciones por separado para cuatro plantas del stock de semillas. La inserción de ADN-T en el gen *TOE1* se encuentra en el tercer exón y se ilustra en la Figura 13A

junto con los sitios de hibridación de los cebadores que se utilizan en las reacciones de PCR (Tabla II). Usando los cebadores específicos se obtuvo amplificación de una única banda del tamaño esperado en el caso de Col-0, y no se produjo amplificación en el caso de las plantas mutantes (Figura 13B). Por otro lado, cuando se usó el cebador específico TOE1-R en combinación con el cebador LB-SALK no se observó amplificación para Col-0, pero sí una única banda amplificada del tamaño esperado en el caso de las mutantes (Figura 13C). Por lo tanto, se verificó que las plantas analizadas son homocigotas para la mutación *toe1-2*.

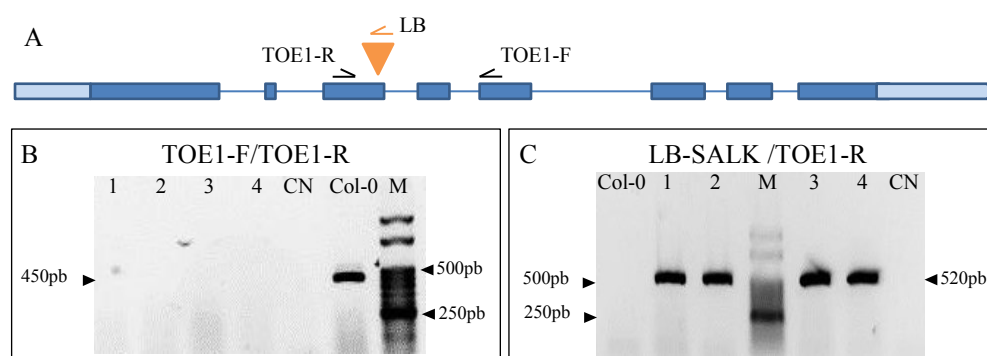


Figura 13. Caracterización genotípica de la mutación *toe1-2*. A) Localización de la inserción de ADN-T y de los sitios de hibridación de los cebadores en el gen *TOE1*. Las barras sólidas representan los exones, las flechas representan a los cebadores y el triángulo indica la inserción de ADN-T. Las representaciones no son a escala. TOE1-F y TOE1-R son los cebadores específicos del gen directo y reverso, respectivamente; LB es el cebador que hibrida en el ADN-T. B) Análisis de los productos de amplificación de plantas salvajes y mutantes empleando cebadores específicos del gen y C) usando TOE1-R y LB. Col-0: planta salvaje; Calles 1-4: plantas *toe1-2/toe2-1*; M: marcador de peso molecular; CN: control negativo sin ADN.

La inserción de ADN-T en el gen *TOE2* se encuentra en el primer exón y se representa en la Figura 14A junto con los sitios de hibridación de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR. Se pudo observar una única banda de amplificación en Col-0 cuando los cebadores utilizados fueron los cebadores específicos del gen (Figura 14B) y ninguna banda cuando se combinaron LB-SALK y TOE2-R (Figura 14C). Para las plantas 1 a 4 no se observaron bandas de amplificación cuando se utilizaron los cebadores específicos (Figura 14B). Una única banda de amplificación se vio cuando se amplificó con la combinación de cebador específico TOE2-R y el cebador LB (Figura 14B). Entonces, se verificó que las plantas analizadas eran también mutantes homocigotas para la inserción de ADN-T en *TOE2*. De esta manera, se constató que las plantas 1 a 4 eran dobles mutantes

homocigotas y se utilizaron para obtener las semillas a utilizar en experimentos posteriores.

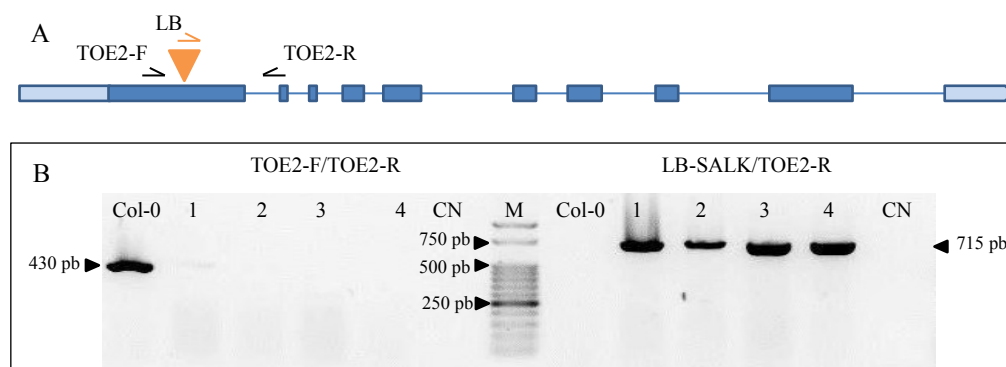


Figura 14: Caracterización fenotípica para la mutación *toe2-1*. A) Localización de la inserción de ADN-T y los sitios de hibridación de los cebadores en el gen *TOE2*. Las barras sólidas representan los exones, las flechas representan los cebadores y el triángulo la inserción de ADN-T. Las representaciones no son a escala. TOE2-F y TOE2-R son los cebadores específicos del gen directo y reverso; LB es el cebador que hibrida en el ADN-T. B) Análisis de los productos de amplificación de plantas salvajes y mutantes usando cebadores específicos del gen y la combinación TOE2-R y LB. Col-0: planta salvaje; Calles 1-4: plantas *toe1-2/toe2-1*; M: marcador molecular; CN: control negativo sin ADN.

4.5 Efecto de la radiación UV-B sobre líneas modificadas en componentes de la ruta de la edad

4.5.1 miR156 y sus genes blanco

Dada la importancia de la interacción *miR156/SPL* en la transición de fase juvenil a adulta y en la regulación de la expresión de *miR172b* (Wu y col., 2009), se analizó el efecto de la radiación UV-B sobre el tiempo de floración en plantas que expresan constitutivamente *miR156* y también en plantas deficientes en *SPL9*, uno de sus genes blanco.

En el caso de las plantas mutantes *sp/9-4* tratadas con UV-B se observó un retraso en el tiempo de floración, de manera análoga a lo observado para plantas Col-0 sometidas a las mismas condiciones de crecimiento (Figura 15A). Las mutantes *sp/9-4* florecieron aproximadamente 2 días después que las correspondientes plantas control. En la Figura 15B se muestra el efecto de la luz UV-B sobre individuos representativos de las plantas mutantes *sp/9-4*.

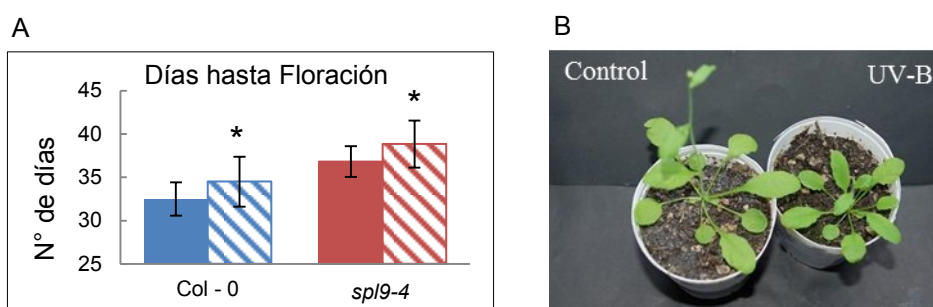


Figura 15: Efecto de la luz UV-B en el tiempo de floración de plantas *spl9-4*. A) Número de días hasta floración en plantas control (bloque sólido) y tratadas (bloque tramado). Se representa como promedio \pm desviación estándar. El asterisco indica diferencia significativa respecto de las plantas no tratadas (Col-0: plantas salvajes, * = $P < 0.05$, $n \geq 10$). B) Individuos representativos de plantas *spl9-4* control y tratadas con UV-B a los 36 días de crecimiento.

A diferencia del retraso en el tiempo de floración observado para plantas Col-0 tratadas con UV-B, en las plantas de la línea *miR156ox* este comportamiento se revirtió, observándose floración temprana en las plantas que crecieron en presencia de luz UV-B (Figura 16A).

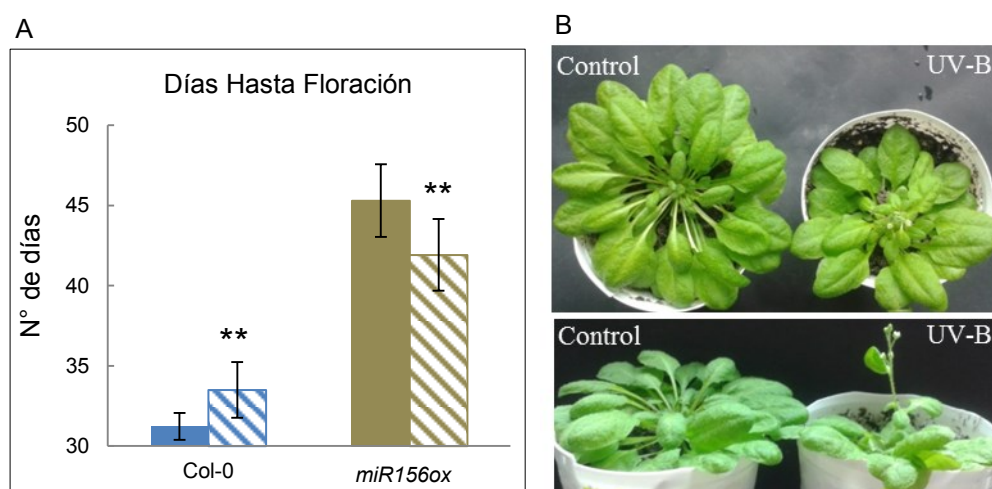


Figura 16. Efecto de la luz UV-B en el tiempo de floración de plantas *miR156ox*. A) Número de días hasta floración en plantas control (bloque sólido) y tratadas (bloque tramado). Se representa como promedio \pm desviación estándar. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto de las plantas no tratadas (Col-0: plantas salvajes, ** = $P < 0.01$, $n \geq 10$). B) Individuos representativos de plantas *miR156ox* control y tratadas con UV-B a los 42 días de crecimiento. Se muestra vista desde arriba y lateral.

Las plantas que sobreexpresan *miR156* tratadas con UV-B, florecieron aproximadamente 4 días antes que las correspondientes plantas sin irradiar. En la

Figura 16B se muestra el efecto de la luz UV-B sobre individuos representativos de plantas *miR156ox*.

4.5.2 *miR172* y sus genes blanco

El microARN *miR172* es un componente principal de la ruta de la edad que actúa corriente abajo de *miR156* reprimiendo la actividad de los genes denominados tipo *AP2*, entre los que se encuentran *TOE1* y *TOE2* (Wu y col., 2009). Por lo tanto, para seguir analizando el papel de la ruta de la edad en el retraso en el tiempo de floración causado por la luz UV-B, se irradiaron plantas de las líneas *miR172ox* y mutantes dobles *toe1-2/toe2-1*.

En el caso de las plantas dobles mutantes *toe1-2/toe2-1*, las plantas tratadas con UV-B mostraron un retraso en el tiempo de floración respecto de las plantas control, de manera similar a lo observado para plantas Col-0. Las plantas irradiadas, retrasaron su floración 3 días respecto de las dobles mutantes control (Figura 17A).

De manera interesante, el tiempo de floración en las plantas que sobreexpresan *miR172* no se modificó en presencia de UV-B con respecto a las plantas control no irradiadas (Figura 17B). La figura 17C muestra la floración de plantas *miR172ox* control e irradiadas con UV-B.

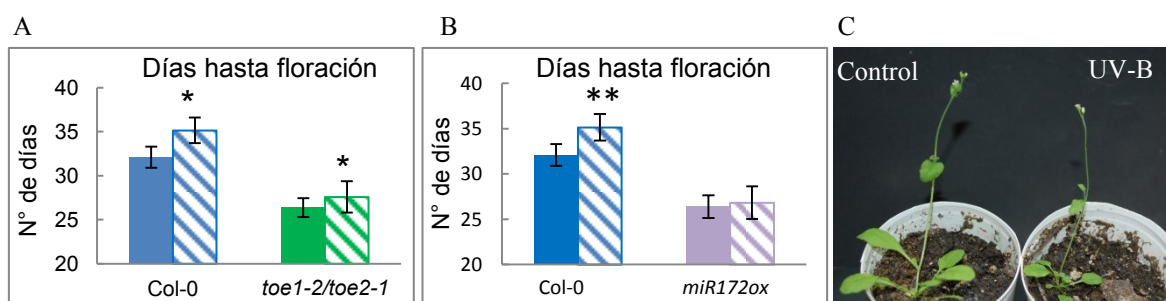


Figura 17. Efecto de la luz UV-B en el tiempo de floración de plantas *miR172ox*. A) Número de días hasta floración en plantas *toe1-2/toe2-1*. B) Número de días hasta floración en plantas *miR172ox*. Los bloques sólidos representan las plantas control y los bloques tramados representan las plantas tratadas. Se representa promedio \pm desviación estándar. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto de las plantas no tratadas (Col-0: plantas salvajes, * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, $n \geq 10$). C) Individuos representativos de plantas *miR172ox* control y tratadas con UV-B a los 28 días de crecimiento.

Discusión

5 DISCUSIÓN

El tiempo de floración es un carácter crucial del desarrollo de las plantas ya que determina que la producción de semillas tenga lugar en la estación adecuada del año cuando las condiciones climáticas son favorables. También, en el caso de flores que no se autofertilizan, asegura que la floración esté sincronizada dentro de una población y con la ocurrencia de polinizadores potenciales. En relación a esto, el control de la transición de fase vegetativa a reproductiva es importante no sólo para garantizar el éxito reproductivo de una especie, sino también por su considerable importancia agronómica. Por ejemplo, la floración prematura resulta en general en la reducción de la biomasa y de la producción de semillas. De igual manera, la prolongación del crecimiento vegetativo puede resultar en el aumento de la biomasa pero al mismo tiempo en la reducción del número y el llenado de semillas (Demura y Ye, 2010; Huijser y Schmid, 2011). Por ello, tanto las transiciones de fase como el proceso de floración son procesos finamente regulados por una compleja red de rutas genéticas que actúan independientemente unas de otras, pero que a su vez se regulan entre sí. Estas rutas integran señales ambientales y endógenas que resultan en el control de la expresión de un conjunto de genes clave; cuando la expresión de estos genes supera un nivel umbral se inicia la floración, que en general es un proceso irreversible (Huijser y Schmid, 2011; Spanudakis y Jackson, 2014).

Este trabajo forma parte de un proyecto que intenta avanzar en el esclarecimiento de los mecanismos moleculares por los cuales la radiación UV-B afecta el tiempo de floración en *Arabidopsis*. El objetivo general del proyecto es analizar la influencia de la luz UV-B sobre las principales rutas genéticas de control de la floración. Hasta el momento solo existen datos descriptivos que indican que la luz UV-B retrasa la floración en algunas pocas especies: *Phaseolus vulgaris*, *Vigna radiata*, *Triticum aestivum* y *Arabidopsis thaliana* (Saile-Mark y Tevini, 1997; Rajendiran y Ramanujam, 2004; Zinser y col., 2007; Yan y col., 2012), pero en ningún caso existe información acerca de los procesos moleculares subyacentes. Específicamente, este trabajo de tesina se enfocó en la ruta de la edad, que es definida por la acción secuencial de miR156 y miR172 y de sus genes blanco correspondientes.

5.1 La radiación UV-B retrasa el tiempo de floración de Arabidopsis

La caracterización fenotípica del tiempo de floración en plantas de Arabidopsis tratadas con UV-B permitió comprobar que el tiempo de floración en plantas salvajes del ecotipo Col-0 se retrasó con respecto a las plantas control sin irradiar (Figuras 5A y 5B). En las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, el retraso fue de aproximadamente 2 días. Este resultado está de acuerdo con el único otro estudio realizado en Arabidopsis, en el que se observó un retraso en el tiempo de floración aun cuando las condiciones de crecimiento y de tratamiento con UV-B fueron diferentes a las utilizadas en el presente trabajo (Yan y col., 2012).

5.2 La expresión de genes pertenecientes a la ruta de la edad se modifica en plantas tratadas con UV-B

A través de estudios de expresión génica en plantas Col-0 tratadas con luz UV-B se determinó que los niveles de acumulación de miR156 en plantas irradiadas son mayores que en las plantas control en todos los puntos analizados (Figura 6A). Asimismo, se analizaron los niveles de dos genes blanco de miR156, *SPL9* y *SPL10*, y se determinó que los transcritos de estos genes se acumulan en menor medida en plantas tratadas con UV-B, posiblemente como consecuencia de una mayor degradación de sus transcritos por miR156 (Figura 6C). La elección de *SPL9* y *SPL10* obedece a que estos dos factores de transcripción participan directamente en la activación de miR172, que a su vez regula la expresión de su propio conjunto de genes blanco (Wang y col, 2009; Wu y col., 2009) Así, *SPL9* y *SPL10* integran los dos sistemas de miARNs entre las etapas tempranas y tardías de desarrollo (Aung y col., 2015). De esta manera, en el presente trabajo se demostró que la luz UV-B afecta la expresión de genes de la ruta de miR156.

La aparición de tricomas abaxiales en las hojas de roseta es uno de los rasgos que caracterizan la transición de la fase juvenil a fase adulta en el desarrollo (Wu y col., 2009). Se ha demostrado que miR156 promueve la expresión de todos los rasgos juveniles, y que es tanto necesario como suficiente para que ocurra esta fase. Por su parte, *SPL9* promueve la mayoría de estos rasgos asociados a la fase adulta, incluyendo la aparición de los tricomas abaxiales. La exposición a UV-B extiende la acumulación de miR156 en el tiempo y la consiguiente reducción de la

expresión de SPL9 y SPL10 resulta en una fase juvenil prolongada, tal como lo evidencia el retraso en la aparición de tricomas en las plantas expuestas a UV-B (Figura 7).

Los estudios de expresión génica también muestran que en plantas Col-0 irradiadas con luz UV-B, los niveles de miR172 se ven reducidos en todos los puntos analizados (Figura 6B). Esta disminución en los niveles de miR172 es consistente con una menor acumulación de los transcritos de SPL9 y SPL10 a causa de la radiación UV-B, los cuales son activadores transcripcionales del precursor de miR172b (Wu y col., 2009; Xu y col., 2016). Por su parte, la acumulación de los transcritos de *TOE1*, *TOE2* y *AP2*, tres de los genes blanco de miR172, no evidencian cambios en respuesta a la exposición a UV-B (Figura 6C); sin embargo esto no es inesperado dado que la regulación de estos genes mediada por miR172 tiene lugar a nivel traduccional principalmente (Aukerman y Sakai, 2003). No obstante, no se puede descartar que se produzcan cambios en la expresión de *TOE3*, *SMZ* o *SNZ* que sean consistentes con el retraso en la floración observado.

5.3 Influencia de la radiación UV-B sobre plantas transgénicas y mutantes en componentes de la ruta de la edad.

Para ampliar los detalles de la participación de la ruta de la edad en el retraso del tiempo de floración producido por la radiación UV-B, se realizaron tratamientos en plantas mutantes *sp/9-4* y en plantas sobreexpresantes *miR156ox*, así como también en mutantes dobles *toe1-2/toe2-1* y plantas sobreexpresantes *miR172ox*.

5.3.1 La exposición a UV-B modifica el tiempo de floración en plantas *sp/9-4* y *miR156ox*

Una vez finalizada la caracterización de las líneas a utilizar y de determinar que sus fenotipos coincidían con datos bibliográficos (Figuras 8 y 9, Tabla V; Wang, Czech y Weigel, 2009; Xu y col., 2016), inicialmente se sometió a plantas de la línea mutante *sp/9-4* a dosis diarias de luz UV-B en las mismas condiciones utilizadas para plantas Col-0. Se observó que las plantas de la línea *sp/9-4* también mostraban un retraso significativo en el tiempo de floración (Figura 15). Teniendo en cuenta que el gen *SPL9* es sólo uno de 10 genes blanco de miR156 (Xu y col., 2016), no se

puede descartar redundancia en la respuesta a luz UV-B. De hecho, los fenotipos de ganancia o pérdida de función revelan un alto grado de redundancia funcional dentro de esta familia (Wu y col., 2009; Xu y col., 2016). En las plantas de la línea *spl9-4* irradiadas con UV-B, uno o más de estos factores de transcripción, podría estar supliendo la función de SPL9 en la mutante. Por ejemplo SPL10, que al igual que SPL9, participa en la mayoría de los aspectos de la regulación del cambio de fase vegetativa, aunque también cumple diferentes funciones (Wu y col., 2009).

En vista de una posible redundancia funcional entre los factores de transcripción SPLs en la respuesta a UV-B se trabajó con una línea transgénica sobreexpresante del gen *MIR156A*. La regulación mediada por miR156 consiste en la escisión de los transcritos de sus genes blanco, lo que impacta negativamente en los niveles de expresión de los genes que regula (Wu y Poethig, 2006). Así, el transgén *35S::MIR156A* completamente o casi completamente elimina la actividad de los genes *SPL* que regula (Schwab y col., 2005; Xu y col., 2016). El tratamiento con radiación UV-B en plantas de la línea *miR156ox* revirtió el retraso de la floración observado para plantas salvajes, y sorprendentemente se observó un fenotipo de floración temprana. Las plantas de la línea *miR156ox* tratadas florecen aproximadamente 4 días antes que las plantas control (Figura 16). Dada la complejidad en las redes que controlan las distintas vías de regulación de la floración, es probable que en las plantas *miR156ox* tratadas con UV-B, esta radiación afecte otro tipo de regulación de algún regulador floral. En condiciones normales, la respuesta de este regulador floral estaría subordinada a la acción de la ruta de miR156; pero, al estar alterada esta vía por la sobreexpresión de miR156, primaría una regulación alternativa. Una posibilidad sería la regulación a nivel de la cromatina de algún gen de floración, resultando como consecuencia en la floración temprana de las plantas *miR156ox* expuestas a UV-B. Estudios adicionales relacionados con este trabajo de tesina determinaron que la radiación UV-B también afecta la regulación negativa a nivel de la cromatina de genes de floración, disminuyendo la tri-metilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3, Dotto y col., 2018). Este resultado, junto con los cambios en los niveles de expresión de miR156 y sus genes blanco *SPL9* y *SPL10* luego de la exposición a luz UV-B, indicaría que el retraso en la floración producido por esta radiación estaría mediado por la acción regulatoria de miR156.

5.3.2 La radiación UV-B retrasa la floración en plantas *toe1-2/toe2-1* pero no modifica la de plantas *miR172ox*

También en este caso, antes de realizar los tratamientos con UV-B se caracterizaron las líneas a utilizar y se determinó que los fenotipos coincidían con la bibliografía (Figuras 13 y 14, Tabla V; Aukerman y Sakai, 2003; Jung y col., 2011).

La contribución de miR172 y de sus genes blanco al retraso en la floración de plantas de *Arabidopsis* irradiadas con UV-B se ensayó exponiendo, en primer lugar, plantas de la línea *toe1-2/toe2-1* al mismo tratamiento que las plantas Col-0. Esta exposición resultó en el retraso de la floración de la línea doble mutante *toe1-2/toe2* respecto de las plantas control (Figura 17A), repitiendo el fenotipo de las plantas salvajes. También en este caso, considerando que *TOE1* y *TOE2* son sólo dos de un total de seis genes blanco de miR172, no se puede descartar que uno o más de estos factores estén compensando la ausencia de los genes mutados.

Con el propósito de prescindir de una posible redundancia de los genes tipo *AP2*, se repitió el tratamiento con luz UV-B en plantas que acumulan constitutivamente miR172, regulando negativamente a todos sus genes blanco. El tiempo de floración en las plantas de la línea *miR172ox* irradiadas con UV-B no mostró diferencia significativa con el de las plantas control sin irradiar (Figura 17 B y C). La ausencia de retraso en el tiempo de floración implica que la ruta de miR172 forma parte de la respuesta a UV-B observada.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, en el presente trabajo de tesina se determinó que la exposición a bajas dosis diarias de radiación UV-B aumenta temporalmente la acumulación de miR156 extendiendo el estadio juvenil de las plantas. En consecuencia, se producen modificaciones en los niveles de expresión de los componentes de la ruta de la edad, la cual involucra una cadena regulatoria corriente abajo que comprende genes de la familia SPL, el microARN miR172 y sus genes blanco pertenecientes a la familia tipo *AP2*. Todo esto finaliza en un retraso en la acumulación umbral de los integradores florales *FT* y *SOC1*, así como en una reducción en la expresión del integrador floral y gen de identidad de meristema floral *LFY* (Dotto y col., 2018), produciéndose así un retraso en la floración de plantas que crecen en presencia de luz UV-B.

Conclusiones

6 CONCLUSIONES

- Se demostró que la radiación UV-B produce un retraso en el tiempo de floración de plantas de *Arabidopsis* en las condiciones de trabajo.
- Mediante ensayos de expresión génica, se evidenció la participación de la ruta de la edad en el retraso de la floración: los niveles de *SPL9*, *SPL10* y *miR172* disminuyen en concordancia con el aumento en la acumulación corriente arriba de *miR156*.
- La mayor acumulación de *miR156* produce una fase juvenil extendida.
- En plantas de las líneas sobreexpresantes *miR156ox* y *miR172ox* irradiadas con UV-B el fenotipo de floración tardía se revierte, sustentando la participación de la ruta de la edad en el fenotipo observado.

Referencias Bibliográficas

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aukerman, M. J. y Sakai, H.** (2003) "Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2 -Like Target Genes", *The Plant cell*, 15(November), pp. 2730–2741.
- Aung, B., Gruber, M. Y. y Hannoufa, A.** (2015) "The MicroRNA156 system: A tool in plant biotechnology", *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), pp. 432–442.
- Bari, A., Orazova, S. y Ivashchenko, A.** (2013) "Mir156- and mir171-binding sites in the protein-coding sequences of several plant genes", *BioMed Research International*, 2013.
- Casadevall, R., Rodriguez R.E., Debernardi J.M., Palatnik, J.F., y Casati P.** (2013) "Repression of Growth Regulating Factors by the MicroRNA396 Inhibits Cell Proliferation by UV-B Radiation in Arabidopsis Leaves", *The Plant Cell*, 25(9), pp. 3570–3583.
- Casati, P., Zhang X., Burlingame A.M. y Walbot V.** (2005) "Analysis of Leaf Proteome after UV-B Irradiation in Maize Lines Differing in Sensitivity", *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(11), pp. 1673–1685.
- Casati, P.** (2013) "Analysis of UV-B regulated miRNAs and their targets in maize leaves.", *Plant signaling & behavior*, 8(10), pp. e26758--1--6.
- Casati, P. y Walbot, V.** (2003) "Gene Expression Profiling in Response to Ultraviolet Radiation in Maize Genotypes with Varying", *Society*, 132(August), pp. 1739–1754.
- Cho, L.-H., Yoon, J. y An, G.** (2017) "The control of flowering time by environmental factors", *The Plant Journal*, 90(4), pp. 708–719.
- Demura, T. y Ye, Z.-H.** (2010) "Regulation of plant biomass production", *Current Opinion in Plant Biology*, 13(3), pp. 298–303.
- Dotto, M., Gómez M.S., Soto M.S. y Casati P.** (2018) "UV-B radiation delays flowering time through changes in the PCR2 complex activity and miR156 levels in *Arabidopsis thaliana*", *Plant Cell & Environment*, en prensa.
- Dotto, M. y Casati, P.** (2017) "Developmental reprogramming by UV-B radiation in plants", *Plant Science*. 264(May), pp. 96–101.
- Edwards, K., Johnstone, C. y Thompson, C.** (1991) "A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis", *Nucleic Acids Research*, 19(6), p. 1349.

- Frohnmeier, H. y Staiger, D.** (2003) "Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection.", *Plant physiology*, 133(4), pp. 1420–1428.
- Gandikota, M., Birkenbihl, R. P., Höhmann, S., Cardon, G. H., Saedler, H. y Huijser, P.** (2007) "The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings", *Plant Journal*, 49(4), pp. 683–693.
- Huijser, P. y Schmid, M.** (2011) "The control of developmental phase transitions in plants", *Development*, 138(19), pp. 4117–4129.
- Jung, J. H., Seo, P. J., Kang, S. K. y Park, C. M.** (2011) "miR172 signals are incorporated into the miR156 signaling pathway at the SPL3/4/5 genes in Arabidopsis developmental transitions", *Plant Molecular Biology*, 76(1–2), pp. 35–45.
- Kataria, S., Jajoo, A. y Guruprasad, K. N.** (2014) "Impact of increasing Ultraviolet-B (UV-B) radiation on photosynthetic processes", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 137, pp. 55–66.
- Kramer, M. F.** (2011) "Stem-loop RT-qPCR for miRNAs", en *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Morales, L. O., Brosche, M., Vainonen, J., Jenkins, G. I., Wargent, J. J., Sipari, N., Strid, A., Lindfors, A. V., Tegelberg, R. y Aphalo, P. J.** (2013) "Multiple Roles for UV RESISTANCE LOCUS8 in Regulating Gene Expression and Metabolite Accumulation in Arabidopsis under Solar Ultraviolet Radiation", *Plant Physiology*, 161(2), pp. 744–759.
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P. y Prasad, S. M.** (2015) "Changing scenario in plant UV-B research: UV-B from a generic stressor to a specific regulator", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 153, pp. 334–343.
- Rajendiran, K. y Ramanujam, M. P.** (2004) "Improvement of Biomass Partitioning, Flowering and Yield by Triadimefon in UV-B Stressed *Vigna radiata* (L.) Wilczek", *Biologia Plantarum*, 48(1), pp. 145–148.
- Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B. y Bartel, D. P.** (2002) "Prediction of plant microRNA targets", *Cell*, 110(4), pp. 513–520.
- Saile-Mark, M. y Tevini, M.** (1997) "Effects of solar UV-B radiation on growth, flowering and yield of central and southern European bush bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.)", *Plant Ecology*, 128(1), pp. 115–125.
- Sambrook, J. y Russel, D.** (2001) *Molecular Cloning: a Cloning Laboratory Manual*. 3era ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Schmittgen, T. D. y Livak, K. J.** (2008) "Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method", *Nature Protocols*, 3(6), pp. 1101–1108.
- Schwab, R., Palatnik, J. F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M. y Weigel, D.** (2005) "Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome", *Developmental Cell*, 8(4), pp. 517–527.
- Shen, J., Xie, K. y Xiong, L.** (2010) "Global expression profiling of rice microRNAs by one-tube stem-loop reverse transcription quantitative PCR revealed important roles of microRNAs in abiotic stress responses", *Molecular Genetics and Genomics*, 284(6), pp. 477–488.
- Singh, V.P., Singh, S., Prasad, S. M. y Parihar, P.** (2017) *UV-B Radiation: From Environmental Stressor to Regulator of Plant Growth*. 1era ed. Wiley.
- Spanudakis, E. y Jackson, S.** (2014) "The role of microRNAs in the control of flowering time", *Journal of Experimental Botany*, 65(2), pp. 365–380.
- Srikanth, A. y Schmid, M.** (2011) "Regulation of flowering time: All roads lead to Rome", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(12), pp. 2013–2037.
- Sun, G.** (2012) "MicroRNAs and their diverse functions in plants", *Plant Molecular Biology*, 80(1), pp. 17–36.
- Sunkar, R.** (ed.) (2009) *MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses*, *Plant Physiology*.
- Tong, L., Xue, H., Xiong, L., Xiao, J., y Zhou, Y.** (2015) "Improved RT-PCR Assay to Quantitate the Pri-, Pre-, and Mature microRNAs with Higher Efficiency and Accuracy", *Molecular Biotechnology*, 57(10), pp. 939–946.
- Ulm, R., Baumann, A., Oravecz, A., Máté, Z., Adám, E., Oakeley, E.J., Schäfer, E. y Nagy, F.** (2004) "Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of Arabidopsis.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(5), pp. 1397–1402.
- Vanhaelewyn, L., Prinsen, E., Van Der Straeten, D. y Vandenbussche, F.** (2016) "Hormone-controlled UV-B responses in plants", *Journal of Experimental Botany*, 67(15), pp. 4469–4482.
- Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F. y Hellens, R. P.** "Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs", *Plant Methods*, 3(1), p. 12.
- Wang, J.-W.** (2014) "Regulation of flowering time by the miR156-mediated age

pathway”, *Journal of Experimental Botany*, 65(17), pp. 4723–4730.

Wang, J. W., Czech, B. y Weigel, D. (2009) “miR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in *Arabidopsis thaliana*”, *Cell*, 138(4), pp. 738–749.

Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J. W., Weigel, D., y Poethig, R. S. (2009) “The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in *Arabidopsis*”, *Cell*, 138(4), pp. 750–759.

Wu, G. y Poethig, R. S. (2006) “Temporal Regulation of Shoot Development in *Arabidopsis thaliana* By Mir156 and Its Target SPL3”, *Development*, 133(18), pp. 3539–3547.

Xu, M., Hu, T., Zhao, J., Park, M. Y., Earley, K. W., Wu, G., Yang, L., Poethig, R. S. (2016) “Developmental Functions of miR156-Regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Genes in *Arabidopsis thaliana*”, *PLoS Genetics*, 12(8), pp. 1–29.

Yamaguchi, A. y Abe, M. (2012) “Regulation of reproductive development by non-coding RNA in *Arabidopsis*: To flower or not to flower”, *Journal of Plant Research*, 125(6), pp. 693–704.

Yan, A., Pan, J., An, L., Gan, Y. y Feng, H. (2012) “The responses of trichome mutants to enhanced ultraviolet-B radiation in *Arabidopsis thaliana*”, *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 113, pp. 29–35.

Zhou, X., Wang, G. y Zhang, W. (2007) “UV-B responsive microRNA genes in *Arabidopsis thaliana*”, *Molecular Systems Biology*, (103), pp. 1–10.

Zhu, Q. H. y Helliwell, C. A. (2011) “Regulation of flowering time and floral patterning by miR172”, *Journal of Experimental Botany*, 62(2), pp. 487–495.

Zinser, C., Seidlitz, H. K., Welzl, G., Sandermann, H., Heller, W., Ernst, D. y Rau, W. (2007) “Transcriptional profiling of summer wheat , grown under different realistic UV-B irradiation regimes”, *Journal of Plant Physiology*, 164, pp. 913–922.